

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIG  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :

C07K 14/00

A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/02908

(43) Internationales  
Veröffentlichungsdatum:

20. Januar 2000 (20.01.00)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE99/02185

(22) Internationales Anmeldedatum:

13. Juli 1999 (13.07.99)

(30) Prioritätsdaten:

198 31 043.9

13. Juli 1998 (13.07.98)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):  
DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM  
STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE];  
Im Neuenheimer Feld 280, D-69129 Heidelberg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BOEHM, Thomas  
[DE/DE]; Freiburger Strasse 30, D-79279 Vorstetten (DE).  
SCHLAKE, Thomas [DE/DE]; Gartenweg 1, D-79194  
Gundelfingen (DE). MEIER, Natalia [DE/DE]; Glückstrasse  
9, D-79104 Freiburg (DE).

(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Truderinger Strasse 246, D-81825  
München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,  
BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD,  
GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP,  
KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW,  
ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG,  
ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI  
Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR,  
NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: INHIBITION OF ALOPECIA

(54) Bezeichnung: HEMMUNG VON ALOPEZIE

(57) Abstract

The invention relates to a method for inhibiting alopecia in which cellular quantities of hair keratins are increased. The invention also relates to a system for identifying substances which inhibit alopecia.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Hemmung von Alopezie, umfassend die Erhöhung der zellulären Mengen von Haarkeratinen und ein System zur Identifizierung von Alopezie hemmenden Substanzen.

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senggal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

### Hemmung von Alopezie

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Hemmung von Alopezie und ein System zur Identifizierung von Alopezie hemmenden Substanzen.

5

Alopezie ist eine weit verbreitete Erkrankung des Haares, bei der vollständiger Haarverlust eintreten kann. Die Ursachen von Alopezie sind nicht bekannt. Insofern ist es auch nicht möglich, gezielt in diese Erkrankung einzugreifen.

10

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde ein Mittel bereitzustellen, mit dem dieses erreicht werden kann.

15

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände der Patentansprüche erreicht.

20

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß bestimmte Formen der Alopezie auf einer gestörten Keratinisierung des Haares beruhen. Ferner hat er erkannt, daß bei Alopezie die mRNA verschiedener Gene, nicht vorhanden, z.B. des Ha3-Gens, oder unterrepräsentiert, z.B. der Ha1-, Ha2- und Ha4-Gene, ist (vgl. Figuren 1 und 2). Die Genprodukte der Ha1-, Ha2-, Ha3- und Ha4-Gene sind Haarkeratine. Der Anmelder hat gefunden, daß die Expression des Ha3-Gens durch ein Genprodukt des whn-Gens reguliert wird. Insbesondere hat er gefunden, daß durch Expression des whn-Gens die Expression des Ha3-Gens induziert werden kann (vgl. Fig. 3). Auch hat er gefunden, daß die Expression anderer Haarkeratin-Gene durch das Genprodukt des whn-Gens wesentlich beeinflußt wird. Der Anmelder hat weiterhin gefunden, daß die Expression des whn-Gens im Verlauf des Haarzyklus schwankt.

30

Insbesondere hat er gefunden, daß die whn-Expression in der Telogenphase des Haarzyklus auf nicht mehr detektierbare Spiegel absinkt. Ferner hat er gefunden, daß das whn-Gen von zwei Promotoren transkribiert werden kann. Der Anmelder hat  
5 seine Erkenntnisse mit Hilfe von Nacktmäusen und Hela-Zellen gewonnen.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders für ein Verfahren zur Hemmung von Alopezie genutzt, das die Erhöhung  
10 der zellulären Menge von Haarkeratinen umfaßt.

Der Ausdruck "Erhöhung der zellulären Menge von Haarkeratinen" weist darauf hin, daß in Zellen die Menge von ein oder mehreren Haarkeratinen, insbesondere von Ha1, Ha2, Ha3 und  
15 Ha4, die gering oder gar nicht vorhanden sein kann, erhöht wird. Dies kann durch übliche Verfahren bzw. Substanzen erreicht werden. Beispielsweise können den Zellen ein oder mehrere Haarkeratine, insbesondere Ha1, Ha2, Ha3 und Ha4, als solche oder in Form von sie kodierender DNA zugegeben werden.  
20 Die DNA kann in üblichen Expressionsvektoren vorliegen. Auch können Substanzen zugegeben werden, welche die Expression von ein oder mehreren Haarkeratinen, insbesondere von Ha1, Ha2, Ha3 und Ha4, aktivieren. Solche Substanzen sind z.B. das Genprodukt des whn-Gens oder eine hierfür kodierende DNA.  
25 Diese kann in üblichen Expressionsvektoren vorliegen. Ferner können Substanzen zugegeben werden, welche die Expression des whn-Gens aktivieren. Diese können ebenfalls als solche oder in Form von sie kodierender DNA vorliegen, wobei letztere auch in üblichen Expressionsvektoren vorliegen kann. Der Ausdruck  
30 "Zellen" umfaßt Zellen jeglicher Art und Abstammung. Ferner umfaßt er Gewebe und Organismen, insbesondere Tiere und den Menschen.

Die Verabreichung von Substanzen, die Alopezie hemmen, kann in  
35 üblicher Weise, vorzugsweise lokal erfolgen. Auch können die Substanzen in üblichen Formulierungen vorliegen. Bei lokaler Verabreichung der Substanzen eignen sich z.B. Cremes, Salben, Shampoos und Haarwasser. Auch können die Substanzen in

Partikeln vorliegen, die leicht aufgenommen werden. Beispiele solcher Partikel sind Liposome. Der Fachmann kennt Verfahren, um für die einzelnen Substanzen die geeigneten Formulierungen bzw. Verabreichungsformen zu finden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein System zur Identifizierung von Substanzen, die sich zur Hemmung von Alopezie eignen. Ein solches System umfaßt die Erhöhung der zellulären Menge von Haarkeratinen und/oder von ihre Genexpression aktivierenden Substanzen. Insbesondere umfaßt das System Tiere oder Zellen, wobei Zellen bevorzugt sind, in denen ein oder mehrere exprimierbare Haarkeratin-Gene und/oder ein oder mehrere exprimierbare Gene, deren Genprodukte die Genexpression von Haarkeratinen aktivieren, jeweils fusioniert mit einem Reporter-Gen vorliegen. Die Haarkeratin-Gene können insbesondere jene von Ha1, Ha2, Ha3 und Ha4 sein. Ferner ist es günstig, wenn die die Genexpression von Haarkeratinen aktivierende Substanz ein Genprodukt des whn-Gens ist. Desweiteren können die vorstehenden Gene eine Wildtyp- oder eine veränderte Sequenz aufweisen, wobei sich letztere von der Wildtyp-Sequenz durch ein oder mehrere Basenpaare unterscheiden kann. Die Unterschiede können in Form von Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen von Basenpaaren vorliegen. Ferner kann ein vorstehendes Reporter-Gen jegliches sein, insbesondere kann es für ein Enzym, z.B. alkalische Phosphatase, oder ein fluoreszierendes Protein, z.B. GFP, kodieren. Desweiteren können die Fusionsgene extrachromosomal vorliegen oder im Zell-Genom, insbesondere anstelle eines oder beider Allele der Haarkeratine und/oder der Gene, deren Genprodukte die Expression von Haarkeratinen aktivieren. Ferner kann das System Stoffe enthalten, die sich zum Nachweis der exprimierten Haarkeratine und/oder von ihre Genexpression aktivierenden Substanzen bzw. der Fusionsgene, eignen. Solche Stoffe können sich zum Nachweis auf dem Nukleinsäure- bzw. Protein-Level eignen.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich Alopezie zu



hemmen. Ferner ist es möglich Alopezie zu diagnostizieren, in dem z.B. die Genexpression von Haarkeratinen und/oder von Substanzen bestimmt wird, welche diese aktivieren. Des weiteren ist es möglich Substanzen zu finden, die sich zur Hemmung von Alopezie eignen. Hierfür wird ein System bereitgestellt, das sich zum schnellen und zuverlässigen Screenen von verschiedensten Substanzen eignet. Damit stellt die vorliegende Erfindung Mittel bereit eine weit verbreitete Erkrankung des Haares zu diagnostizieren und zu therapieren.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

Fig. 1 zeigt eine in situ RNA-Hybridisierung mit einer Sonde für mHa3 in normalen (whn +/+) und mutanten (whn -/-) Mäusen. Die Transkripte für mHa3 (sichtbar als braune Silberkörner) sind in Haarfollikeln der Nacktmaus nicht nachweisbar. Die Linie entspricht 100  $\mu$ m.

Fig. 2 zeigt die Expression von whn und Haarkeratinen im Haarfollikel der Maus.

A. Northern Filter-Hybridisierung mit RNA aus Gesamthaut von normalen Mäusen (whn +/+) und Nacktmäusen (whn -/-) mittels Sonden für hprt- und whn-Gene sowie Ha1-, Ha3-, Ha4-Gene zu drei Zeitpunkten nach der Geburt dP7, 7 Tage nach Geburt etc.).

B. In situ RNA-Hybridisierung in Haut aus normalen (whn +/+) und Nacktmäusen (whn -/-) mit Sonden für Ha1-, Ha3- und Ha4-Gene. Ein Autoradiogramm von Hautschnitten am Tag 7 nach der Geburt ist gezeigt.

Fig. 3 zeigt die Regulation der Keratin-Gen-Expression. Hela-Zellen wurden mit einem whn-Expressions-Konstrukt transient transfiziert (+) und die

Anwesenheit von Ha3-spezifischer mRNA wurde über eine RT-PCR nachgewiesen. Die Molekulargewichtsmarker sind in bp angegeben.

5

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

10

**Beispiel 1: Nachweis des Verlustes der Expression des Ha3-Gens in Mäusen mit Alopezie.**

15

Es wurde das "Representational Difference Analysis" (RDA)-Verfahren durchgeführt. Dieses Verfahren umfaßt die Isolierung von mRNA aus Hautzellen von (whn +/+) -Mäusen bzw. (whn -/-) -Mäusen (Alopezie aufweisende Mäuse, die keine Expression des whn-Gens aufweisen), die Umschreibung der mRNA in cDNA und die Differenzierung der cDNA, wodurch solche identifiziert wird, die in (whn -/-) -Mäusen unter- bzw. überexprimiert wird.

20

25

A) Sequenz der Oligonukleotidadaptoren

Folgende Oligonukleotidadaptorenpaare wurden für die RDA benötigt:

30

R-Bgl-12: 5'-GATCTGCGGTGA-3'

R-Bgl-24: 5'-AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCA-3'

R-Bgl-12: 5'-GATCTGTTCATG-3'

R-Bgl-24: 5'-ACCGACGTCGACTATCCATGAACA-3'

35

N-Bgl-12: 5'-GATCTTCCCTCG-3'

N-Bgl-24: 5'-AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAA-3'

### B) Herstellung von poly A-mRNA aus den miteinander zu vergleichenden Geweben

5                   Zunächst wurde RNA aus der Haut von (whn +/+)-  
bzw. (whn -/-)-Mäusen nach der "Single-Step  
RNA-Extraction"-Methode (Chomczynski and  
Sacchi, 1987) gewonnen. Die poly A-mRNA-  
Fraktionen aus den beiden RNA-Populationen wur-  
den anschließend mit Hilfe von Dynabeads  
10                   Oligo(dT) nach dem entsprechenden Protokoll der  
Firma Dynal isoliert.

### C) Synthese doppelsträngiger cDNA

15                   Zur Synthese von doppelsträngiger (whn +/+)-  
bzw. (whn  
-/-)-cDNA wurde das "Ribo Clone cDNA Synthesis  
Kit" der Firma Promega verwendet. Jeweils 4 µg  
poly A-mRNA wurden eingesetzt, um ungefähr 2 µg  
20                   cDNA zu erhalten.

### D) Differenzanalyse

25                   1. Restriktionsverdau der doppelsträngigen  
cDNAs

30                   a) Ungefähr 2 µg jeder cDNA wurden in einem  
100 µl-Reaktionsansatz mit der  
Restriktionsendonuklease DpnII 2 h bei  
37°C verdaut.

35                   b) Die Reaktionslösungen wurden anschließend  
zweimal mit einem Phenol/Chloroform-  
Gemisch (1:1) und einmal mit 100%igem  
Chloroform extrahiert.

c) Die in den wäßrigen Phasen der beiden  
Reaktionsansätze enthaltene DNA wurde



jeweils mit 2  $\mu\text{g}$  Glykogen, 50  $\mu\text{l}$  10 M Ammoniumacetat und 650  $\mu\text{l}$  100% Ethanol versetzt und 20 min auf Eis gefällt.

Nach 14-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 14000 upm wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernung der alkoholischen Phase wurde die getrocknete DNA in 20  $\mu\text{l}$  TE-Puffer resuspendiert.

2. Ligation der cDNAs an das R-Bgl-Oligonukleotidadaptorenpaar

a) In einem Reaktionsgefäß wurden vereinigt:  
20  $\mu\text{l}$  geschnittene cDNA (gesamter Reaktionsansatz aus Punkt D)1c)

8  $\mu\text{g}$  R-Bgl-24

4  $\mu\text{g}$  R-Bgl-12

6  $\mu\text{l}$  10 x Ligase Puffer

x  $\mu\text{l}$  Wasser

57  $\mu\text{l}$  Endvolumen

b) Der Reaktionsansatz wurde in einem Thermocycler (Peltier Thermocycler PTC-200, MJ Research) auf 50°C erhitzt, 1 min auf dieser Temperatur gehalten und dann im Laufe einer Stunde wieder auf 10°C abgekühlt (ramp rate: 0,1°C/9 sec).

c) Nach Hinzufügen von 3  $\mu\text{l}$  T4 DNA Ligase (1 U/ $\mu\text{l}$ ) wurde das Gemisch über Nacht bei 16°C inkubiert.

3. Synthese von "Repräsentationen" der miteinander zu vergleichenden cDNA-

## Populationen

- 5 a) Zur Generierung sog. "Repräsentationen" der ligierten cDNAs wurde zunächst das Volumen der Ligationsansätze aus Punkt 2c) durch Zugabe von jeweils 140  $\mu$ l Wasser auf 200  $\mu$ l ergänzt.

10 Aus dieser verdünnten Lösung wurden dann pro cDNA-Population (whn +/+)- bzw. (whn -/-)-Haut 30 Reaktionen zu jeweils 200  $\mu$ l angesetzt.

15 Einem solchen Ansatz wurden der Reihe nach folgende Reaktanden zugegeben:

143  $\mu$ l Wasser  
20  $\mu$ l 10x PCR-Puffer  
20  $\mu$ l 2 mM dNTPs  
10  $\mu$ l 25 mM Mg-Chlorid  
20 2  $\mu$ l R-Bgl-24 (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)  
4  $\mu$ l verdünnter Ligationsansatz

- b) PCR:  
3 min: 72°C  
25 Hinzufügen von 1  $\mu$ l Taq-DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)  
20 x: 5 min: 95°C  
3 min: 72°C  
zuletzt: Abkühlen auf 4°C.

- 30 c) Zur Aufbereitung der Reaktionslösungen wurden jeweils 4 Reaktionsansätze in einem Gefäß vereinigt.

35 Extraktion: 2 x mit jeweils 700  $\mu$ l Phenol/Chloroform (1:1), 1 x mit Chloroform 100%;  
Fällung: Zugabe von 75  $\mu$ l 3 M Na-

Acetatlösung (pH 5,3) und 800  $\mu$ l 2-Propanol zu jedem Reaktionsgefäß, 20 min Eis.

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

5 Waschen des DNA-Pellets mit Ethanol 70% und Resuspension in soviel Wasser, daß eine Konzentration von 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l resultierte.

10

4. Restriktionsverdau der "Repräsentationen"

15

a) Zur Entfernung der R-Bgl-Oligonukleotidadaptoren wurden 300  $\mu$ g jeder Repräsentation (whn +/+)-Haut bzw. (whn -/-)-Haut einem Restriktionsverdau unterzogen. Es wurde nach Zugabe der folgenden Reaktanden 4 h bei 37°C inkubiert:

20

600  $\mu$ l cDNA-Repräsentation (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l)  
140  $\mu$ l 10 x DpnII-Puffer  
100  $\mu$ l DpnII (10 U/ $\mu$ l)  
560  $\mu$ l Wasser.

25

b) Der Restriktionsverdau-Ansatz wurde vor dessen Aufbereitung auf 2 Gefäße aufgeteilt.

30

Extraktion: 2 x Phenol/Chloroform (1:1), 1 x Chloroform 100%;

Fällung: Zugabe von 70  $\mu$ l 3 M Na-Acetat (pH 5,3), 700  $\mu$ l 2-Propanol zu jedem Gefäß, 20 min Eis;

35

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

Waschen des DNA-Pellets mit Ethanol 70% und Resuspension in soviel Wasser, daß eine Konzentration von 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l

resultierte.

Die so erhaltene, DpnII-verdaute (whn +/+)-Haut-cDNA-Repräsentation stellte die in der subtraktiven Hybridisierung einzusetzende Driver-DNA-Population dar.

#### 5. Synthese der Tester-DNA-Population

a) 20 µg der mit DpnII verdauten (whn -/-)-Haut-cDNA-Repräsentation (= Tester-DNA) wurden in einem TAE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt:

40 µl Tester-DNA (0,5 µg/µl)

50 µl Te-Puffer

10 µl 10 x Loading Buffer

wurden auf ein 1,2% Agarose-TAE-Gel aufgetragen. Es wurde solange Spannung an das Gel gelegt, bis die Bromphenolblau-Komponente des Loading Buffers ungefähr 2 cm weit gewandert war.

b) Anschließend wurden die Repräsentations-DNA enthaltenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des "Agarose Gel DNA Extraction Kits" der Firma Boehringer Mannheim eluiert.

Die DNA-Extrakte wurden vereinigt, so daß insgesamt 60 µl Lösung erhalten wurden. Die Konzentration dieser Lösung wurde durch Elektrophorese von 5 µl in einem 1% Agarose-Gel abgeschätzt.

c) Zuletzt erfolgte eine Ligation der Tester-DNA mit dem J-Oligonukleotid-Paar:

2 µg Tester-DNA-Eluat

11

6  $\mu$ l 10 x Ligase Puffer

4  $\mu$ l J-Bgl-24 (2  $\mu$ g/ $\mu$ l)

4  $\mu$ l J-Bgl-12 (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)

x  $\mu$ l Wasser

5

57  $\mu$ l Endvolumen

d) Überführung des Reaktionsansatzes in Thermocycler: -

1 min: 50°C

10

Abkühlen auf 10°C in 1 h (ramp rate: 0,1°C/9 sec).

e) Nach Hinzufügen von 3  $\mu$ l T4 DNA Ligase (1 U/ $\mu$ l) Inkubation bei 16°C über Nacht.

15

f) Einstellung der Konzentration der Tester-DNA auf ungefähr 10 ng/ $\mu$ l durch Zugabe von 120  $\mu$ l Wasser.

20

## 6. Subtraktive Hybridisierung

a) 80  $\mu$ l Driver-DNA (40  $\mu$ g) aus Schritt 4. und 40  $\mu$ l (0,4  $\mu$ g) verdünnte, mit J-Oligonukleotiden ligierte Tester-DNA aus Schritt 5. wurden in einem Reaktionsgefäß vereinigt und 2 x mit Phenol/Chloroform (1:1) und einmal mit Chloroform 100% extrahiert.

25

b) Fällung durch Zugabe von 30  $\mu$ l 10 M Ammoniumacetat, 380  $\mu$ l Ethanol 100%; 10 min -70°C.

30

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

35

Anschließend: 2 x Waschen des Pellets

mit Ethanol 70%, kurze Zentrifugation nach jedem Waschschrift; Trocknen des DNA-Pellets.

5

10

15

20

25

30

35

c) Die Resuspension der DNA erfolgte in 4  $\mu$ l EE x3-Puffer (30 mM EPPS, pH 8,0 bei 20°C (Firma Sigma), 3 mM EDTA) - hierbei wurde ungefähr 2 min auf- und abpipettiert, dann 5 min auf 37°C erwärmt, kurz "gevortext" und zuletzt die Lösung durch Zentrifugieren wieder am Gefäßboden vereinigt. Zuletzt wurde die Lösung mit 35  $\mu$ l Mineralöl überschichtet.

d) Überführen des Reaktionsansatzes in Thermocycler:  
5 min: 98°C,  
Abkühlen auf 67°C und sofortige Zugabe von 1  $\mu$ l 5 M NaCl zur DNA,  
20 h Inkubation bei 67°C.

#### 7. Synthese des ersten Differenzprodukts

a) Nachdem das Mineralöl möglichst vollständig entfernt worden war, wurde die DNA schrittweise verdünnt:

1. Zugabe von 8  $\mu$ l TE (+ 5  $\mu$ g/ $\mu$ l Hefe-RNA),
2. Zugabe von 25  $\mu$ l TE - danach gründliches Mischen,
3. Zugabe von 362  $\mu$ l TE - Vortex.

b) Für jede subtraktive Hybridisierung wurden 4 PCRs angesetzt. Pro Reaktion:

- 127  $\mu$ l Wasser  
20  $\mu$ l 10 x Puffer

20  $\mu$ l 2 mM dNTPs  
5  $\mu$ l 25 mM Mg-Chlorid  
20  $\mu$ l verdünnte Hybridisierungslösung (aus Schritt 7a))

5

## c) PCR-Programm:

3 min: 72°C

Zugabe von 1  $\mu$ l Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ l)

10

5 min: 72°C

Zugabe von 2  $\mu$ l Primer J-Bgl-24 (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)

10 x: 1 min: 95°C

3 min: 70°C

zuletzt: 10 min: 72°C; dann Abkühlen auf Raumtemperatur.

15

## d) Die 4 Reaktionsansätze wurden in einem 1,5 ml-Gefäß vereinigt.

Extraktion: 2 x Phenol/Chloroform (1:1), 1 x Chloroform 100%.

20

Nach Zugabe von 2  $\mu$ g Glykogen Carrier:Fällung mit 75  $\mu$ l 3 M Na-Acetat (pH 5,3), 800  $\mu$ l 2-Propanol, 20 min Eis.

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

25

Waschen des DNA-Pellets mit Ethanol 70%.

Nach Trocknen der DNA Resuspension in 40  $\mu$ l Wasser.e) 20  $\mu$ l der resuspendierten DNA aus d) wurden einem "Mung Bean Nuclease-Verdau" (=MBN) unterzogen:

30

20  $\mu$ l DNA4  $\mu$ l 10 x Mung Bean Nuclease Buffer (Fa. NEB)

35

14  $\mu$ l Wasser2  $\mu$ l Mung Bean Nuclease (10 U/ $\mu$ l; Fa. NEB)

35 min, 30°C.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 160  $\mu$ l 50 mM Tris-HCl (pH 8,9) und 5-minütige Inkubation bei 98°C abgebrochen. Anschließend wurde das Gefäß bis zum nächsten Schritt auf Eis gesetzt.

f) Während der MBN-Inkubation wurden 4 weitere PCRs angesetzt (auf Eis):

127  $\mu$ l Wasser

20  $\mu$ l 2 mM dNTPs

10  $\mu$ l 25 mM Mg-Chlorid

2  $\mu$ l J-Bgl-24 (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)

20  $\mu$ l MBN-verdaute DNA.

g) PCR-Programm:

1 min: 95°C

Abkühlenlassen auf 80°C, Zugabe von 1  $\mu$ l Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ l),

18 x: 1 min: 95°C

3 min: 70°C,

zuletzt: 10 min: 72°C; Abkühlenlassen auf 4°C.

h) Die 4 PCR-Ansätze wurden in einem Gefäß vereinigt.

Extraktion: 2 x Phenol/Chloroform (1:1), 1 x Chloroform 100%.

Fällung: 75  $\mu$ l 3 M Na-Acetat (pH 5,3), 800  $\mu$ l 2-Propanol, 20 min Eis.

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

Waschen des DNA-Pellets mit Ethanol 70%.

Resuspension der DNA in 100  $\mu$ l Wasser (resultierende Konzentration: 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l);



die auf diese Weise erhaltene Lösung stellte das erste Differenzprodukt dar.

8. Austausch der Oligonukleotidadaptoren des Differenzprodukts

a) Entfernung der Oligonukleotidadaptoren durch Restriktionsverdau mit DpnII:

40  $\mu$ l Differenzprodukt 1 (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l)

30  $\mu$ l 10 x DpnII Puffer

15  $\mu$ l DpnII (10 U/ $\mu$ l)

215  $\mu$ l Wasser

2 h 37°C.

b) Aufarbeitung des Reaktionsansatzes:

Extraktion: 2 x Phenol/Chloroform (1:1), 1 x Chloroform 100%.

Fällung: 33  $\mu$ l 3 M Na-Acetat (pH 5,3), 800  $\mu$ l Ethanol 100%, 20 min - 20°C.

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

Waschen des Pellets in Ethanol 70% und Resuspension in 40  $\mu$ l Wasser.

c) Ligation des Differenzprodukts an N-Bgl-Oligonukleotidadaptorenpaar

1  $\mu$ l der aufgearbeiteten DNA-Lösung aus Schritt b) wurde mit 9  $\mu$ l Wasser zu einer Konzentration von 50 ng/ $\mu$ l verdünnt; 4  $\mu$ l dieser Lösung wurden in folgender Reaktion eingesetzt:

4  $\mu$ l DpnII verdautes Differenzprodukt 1 (200 ng)

6  $\mu$ l 10 x Ligase Puffer

2,5  $\mu$ l N-Bgl-24 (3,5  $\mu$ g/ $\mu$ l)

2  $\mu$ l N-Bgl-12 (2  $\mu$ g/ $\mu$ l)

42,5  $\mu$ l Wasser.

- d) Nach Überführen des Reaktionsansatzes in Thermocycler:

5

1 min: 50°C,

Abkühlenlassen innerhalb einer Stunde auf 10°C (ramp rate: 0,1°C/9 sec).

- e) Nach Hinzugeben von 3  $\mu$ l T4 DNA Ligase (1  $\mu$ /l), Inkubation bei 16°C über Nacht.

10

#### 9. Synthese des 2. Differenzprodukts

15

Der Ligationsansatz aus Schritt 8e) wurde durch Zugabe von 100  $\mu$ l Wasser auf eine Konzentration von 1,25 ng/ $\mu$ l verdünnt. 40  $\mu$ l dieser Verdünnung (50 ng) wurden mit 80  $\mu$ l Driver-DNA (siehe Punkt 4.) gemischt und erneut gemäß den Schritten 6. bis 8. behandelt. Beim Wechsel der Oligonukleotidadaptoren (Schritt 8.) wurden dieses Mal die J-Bgl-Oligonukleotide an das neu entstandene Differenzprodukt 2 ligiert.

20

25

#### 10. Synthese des 3. Differenzprodukts

30

Die Konzentration des mit den J-Bgl-Oligos ligierten Differenzprodukts 2 wurde auf eine Konzentration von 1 ng/ $\mu$ l reduziert. 10  $\mu$ l dieser Lösung wurden wiederum mit 990  $\mu$ l Wasser (+ 30  $\mu$ g Hefe-RNA) verdünnt, so daß die Konzentration nunmehr 10 pg/ $\mu$ l betrug. Die subtraktive Hybridisierung wurde mit 100 pg (10  $\mu$ l) J-ligiertem Differenzprodukt 2 und 40  $\mu$ g (80  $\mu$ l) Driver-DNA aus Schritt 4.) durchgeführt.

35

Ansonsten wurde wie beim 1. und 2. Differenzprodukt nach den Schritten 6. bis 8. vorgegangen. Eine Ausnahme bildete die PCR nach der MBN-Reaktion (Punkt 7.g) - hier wurden nur 18 statt 22 Cyclen durchgeführt.

#### 11. Klonierung des 3. Differenzprodukts

Das 3. Differenzprodukt wurde zunächst einem Restriktionsverdau mit DpnII unterzogen, wodurch die Oligonukleotidaptoren entfernt wurden. Das Reaktionsprodukt wurde anschließend auf ein TAE-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die getrennten DNA-Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA eluiert und in einen mit BamHI geschnittenen Vektor (pBS Not) kloniert.

#### 12. Charakterisierung der Differenzprodukte

Um zu bestätigen, daß es sich bei den klonierten DNA-Fragmenten nicht um Methodenartefakte handelte, sondern um Sequenzen, die tatsächlich in den untersuchten DNA-Repräsentationen enthalten waren, wurden Southern Analysen durchgeführt, bei denen die untersuchten cDNA-Repräsentationen mit den radioaktiv markierten Klonierungsprodukten hybridisiert wurden.

Anschließend wurden diejenigen DNA-Fragmente, die sich in der Southern Analyse als "echte" Differenzprodukte erwiesen hatten, mittels Northern Hybridisierungen untersucht: es wurden RNAs aus



den untersuchten Geweben (whn +/+)-Haut-cDNA und (whn -/-)-Haut-cDNA) geblottet und mit den radioaktiv markierten Klonierungsprodukten hybridisiert. Hierdurch wurde die differentielle Expression dieser Sequenzen in den untersuchten Geweben bestätigt. Eine Analyse der Sequenzen ergab, daß in nu/nu-Mäusen (Alopezie aufweisende Mäuse) das Ha3-Gen nicht exprimiert wird (vgl. Fig. 1).

**Beispiel 2: Expression von Haarkeratin- und whn-Genen in normalen und Alopezie aufweisenden Mäusen.**

Aus der Haut von unterschiedlich alten normalen (whn +/+) und nackten (whn -/-) Mäusen wurde RNA isoliert, in Agarose-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt, auf Filter transferiert und mit genspezifischen Sonden hybridisiert.

Die verwendeten Sonden waren wie folgt:

mHa1: Nukleotide 1331 - 1551; Genbank "Accession"-Nr. M27734

mHa3: Nukleotide 1007 - 1204; Genbank "Accession"-Nr. X75650

mHa4: Nukleotide 1303 - 1542, vgl. Bertolino, A.P. et al., J. Invest. Dermatol. 94, (1990) 297 - 303

whn: Nukleotide 1141 - 1374; Genbank "Accession"-Nr. X81593

Es zeigte sich, daß Haarkeratin- und whn-Gene in Alopezie aufweisenden Mäusen nicht bzw. nur schwach exprimiert werden.

**Beispiel 3: Nachweis der Expressions-Induktion des Ha3-Gens durch das Genprodukt des whn-Gens.**

Ein am N-terminalen Epitop "getaggttes" whn-Gen wurde in den Expressionsvektor pTRE (Clontech) inseriert. Das erhaltene DNA-Konstrukt wurde für eine transiente Transfektion der Hela Tet-On Zell-Linie (Clontech) mittels des Calciumphosphat-Copräzipitations-Verfahrens verwendet. Die Zellen wurden unmittelbar danach mit 5 µg/ml Docyclin behandelt. 24 h später wurde 1 mM Natriumbutytrat zugegeben. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und einem RT-PCR-Verfahren unterzogen. Die im PCR-Verfahren verwendeten Primer waren wie folgt:

hHa3:

5'-CTGATCACCAACGTGGAGTC-3',

5'-TACCCAAAGGTGTTGCAAGG-3'.

Das PCR-Verfahren umfaßte 35-40 Zyklen mit jeweils 30 sec bei 95°C, 30 sec bei 58°C und 1 min bei 72°C.

Es zeigte sich, daß durch die Expression des whn-Gens eine Expression des Ha3-Gens induziert wurde. Parallele Kontrollen, in denen keine Transfektion mit dem whn-Gen erfolgte, führten zu keiner Induktion der Ha3-Gen-Expression.

#### **Beispiel 4: Herstellung eines erfindungsgemäßen Systems**

Aus einer BAC-Bibliothek der Firma Genome Systems (St. Louis, Missouri, USA;) wurde ein mit BAC-whn bezeichneter BAC-Klon isoliert, der das gesamte whn-Gen der Maus umfaßt (vgl. Schorpp, M. et al., Immunogenetics 46, (1997), 509-515).

Ferner wurde ein mit pMB096-whn-GFP bezeichneter Shuttle-Vektor verwendet, der das whn-Gen der Maus enthielt, wobei bei diesem in Exon3 das Reporter-Gen GFP vorlag (vgl. Nehls, M. et al., Science 272, (1996), 886-889).

BAC-whn wurde zur Transformation des recA<sup>+</sup> E.coli-Stammes CBTS verwendet. Die Transformation erfolgte durch Elektroporation. Klone wurden isoliert und mit pMB096-whn-GFP mittels Elektroporation transformiert. Es erfolgte eine homologe Rekombination zwischen dem BAC-Klon und dem Shuttle-Vektor im Bereich des whn-Gens, wodurch ein mit BAC-whn-GFP bezeichneter Vektor erhalten wurde. Dieser wies im whn-Gen das Reporter-Gen GFP auf.

BAC-whn-GFP wurde zur Transfektion von COS-Zellen verwendet. Die Transfektion erfolgte mittels des Calciumphosphat-Coprecipitations-Verfahrens. Es wurden COS-Zellen erhalten, die für ein Fusionsgen aus whn und GFP kodierten.

Es zeigte sich, daß diese Zellen geeignet waren, Substanzen zu identifizieren, welche die Genexpression von whn induzieren konnten. Solche Substanzen eigneten sich zur Hemmung von Alopezie.

**Patentansprüche**

5

1. Verfahren zur Hemmung von Alopezie, umfassend die Erhöhung der zellulären Menge von Haarkeratinen.

10

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei den Zellen Haarkeratine zugegeben werden.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Haarkeratine in Form von sie exprimierender DNA vorliegen.

15

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3, wobei den Zellen die Genexpression von Haarkeratinen aktivierende Substanzen zugegeben werden.

20

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die Substanzen in Form von sie exprimierender DNA vorliegen.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-5, wobei die Haarkeratine Ha1, Ha2, Ha3 und Ha4 umfassen.

25

7. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, wobei die Substanzen das Genprodukt des whn-Gens und/oder die Expression des whn-Gens aktivierende Substanzen umfassen.

30

8. System zur Identifizierung von Alopezie hemmenden Stoffen, umfassend die Erhöhung der zellulären Menge von Haarkeratinen und/oder von ihre Genexpression aktivierenden Substanzen.

35

9. System nach Anspruch 8, wobei das System Zellen umfaßt, in denen ein oder mehrere exprimierende Haarkeratin-Gene fusioniert mit einem Reporter-Gen vorliegen.

10. System nach Anspruch 8 oder 9, wobei die Haarkeratine,

Ha1, Ha2, Ha3 und Ha4 umfassen.

- 5      11. System nach einem der Ansprüche 8 - 10, wobei das System Zellen umfaßt, in denen ein oder mehrere exprimierbare die Genexpression von Haarkeratinen aktivierende Substanzen fusioniert mit einem Reporter-Gen vorliegen.
- 10      12. System nach einem der Ansprüch 8 - 11, wobei die Substanzen ein Genprodukt des whn-Gens umfassen.
- 15      13. System nach einem der Ansprüche 9 - 12, wobei das Reporter-Gen für ein Enzym kodiert.
14. System nach einem der Ansprüche 9-12, wobei das Reporter-Gen für ein fluoreszierendes Protein kodiert.
- 20      15. System nach einem der Ansprüche 9-14, wobei die Fusionsgene extrachromosomal vorliegen.
16. System nach einem der Ansprüche 9-14, wobei die Fusionsgene im Zell-Genom integriert sind.
- 25      17. System nach einem der Ansprüche 9-16, wobei ferner Stoffe zum Nachweis der exprimierten Haarkeratine und/oder von ihre Genexpression aktivierende Substanzen bzw. der Fusionsgene vorliegen.



1/3

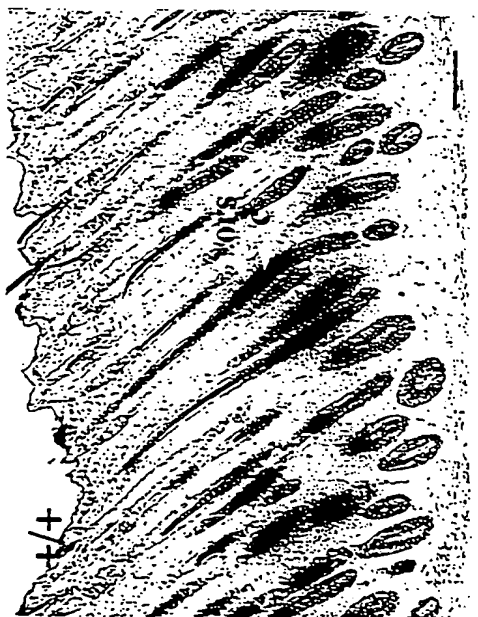


Fig. 1



6

6

6

6

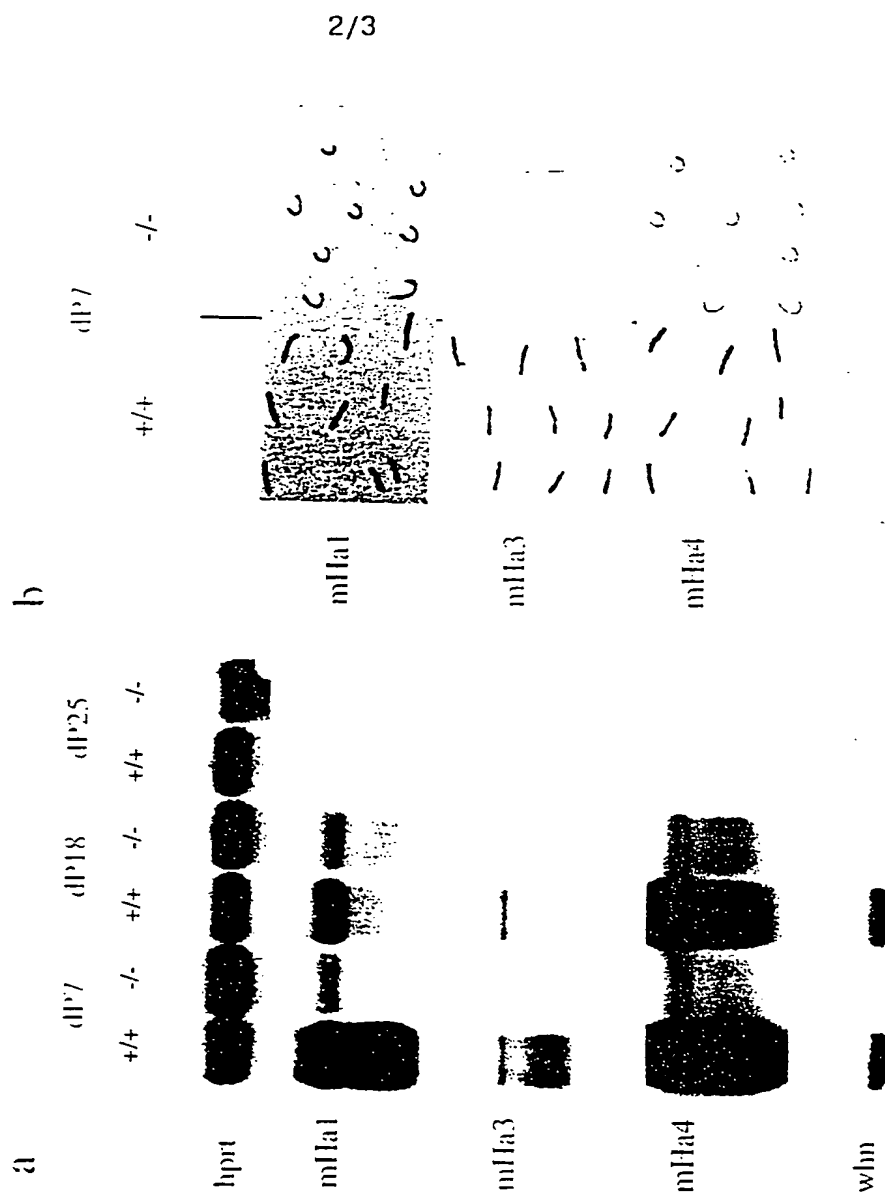


Fig. 2



0

4

4

4

3/3



Fig. 3



Unser Zeichen: K 2705 - hu / msl

### Hemmung von Alopezie

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Hemmung von Alopezie und ein System zur Identifizierung von Alopezie hemmenden Substanzen.

5

Alopezie ist eine weit verbreitete Erkrankung des Haares, bei der vollständiger Haarverlust eintreten kann. Die Ursachen von Alopezie sind nicht bekannt. Insofern ist es auch nicht möglich, gezielt in diese Erkrankung einzugreifen.

10

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde ein Mittel bereitzustellen, mit dem dieses erreicht werden kann.

15

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände der Patentansprüche erreicht.

20

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß bestimmte Formen der Alopezie auf einer gestörten Keratinisierung des Haares beruhen. Ferner hat er erkannt, daß bei Alopezie die mRNA verschiedener Gene, nicht vorhanden, z.B. des Ha3-Gens, oder unterrepräsentiert, z.B. der Ha1-, Ha2- und Ha4-Gene, ist (vgl. Figuren 1 und 2). Die Genprodukte der Ha1-, Ha2-, Ha3- und Ha4-Gene sind

25

Haarkeratine. Der Anmelder hat gefunden, daß die Expression des Ha3-Gens durch ein Genprodukt des whn-Gens reguliert wird. Insbesondere hat er gefunden, daß durch Expression des whn-Gens die Expression des Ha3-Gens induziert werden kann (vgl. Fig. 3). Auch hat er gefunden, daß die Expression anderer

30

Haarkeratin-Gene durch das Genprodukt des whn-Gens wesentlich beeinflußt wird. Der Anmelder hat weiterhin gefunden, daß die Expression des whn-Gens im Verlauf des Haarzyklus schwankt.

1944



Insbesondere hat er gefunden, daß die whn-Expression in der Telogenphase des Haarzyklus auf nicht mehr detektierbare Spiegel absinkt. Ferner hat er gefunden, daß das whn-Gen von zwei Promotoren transkribiert werden kann. Der Anmelder hat seine Erkenntnisse mit Hilfe von Nacktmäusen und Hela-Zellen gewonnen.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders für ein Verfahren zur Hemmung von Alopezie genutzt, das die Erhöhung der zellulären Menge von Haarkeratinen umfaßt.

Der Ausdruck "Erhöhung der zellulären Menge von Haarkeratinen" weist darauf hin, daß in Zellen die Menge von ein oder mehreren Haarkeratinen, insbesondere von Ha1, Ha2, Ha3 und Ha4, die gering oder gar nicht vorhanden sein kann, erhöht wird. Dies kann durch übliche Verfahren bzw. Substanzen erreicht werden. Beispielsweise können den Zellen ein oder mehrere Haarkeratine, insbesondere Ha1, Ha2, Ha3 und Ha4, als solche oder in Form von sie kodierender DNA zugegeben werden. Die DNA kann in üblichen Expressionsvektoren vorliegen. Auch können Substanzen zugegeben werden, welche die Expression von ein oder mehreren Haarkeratinen, insbesondere von Ha1, Ha2, Ha3 und Ha4, aktivieren. Solche Substanzen sind z.B. das Genprodukt des whn-Gens oder eine hierfür kodierende DNA. Diese kann in üblichen Expressionsvektoren vorliegen. Ferner können Substanzen zugegeben werden, welche die Expression des whn-Gens aktivieren. Diese können ebenfalls als solche oder in Form von sie kodierender DNA vorliegen, wobei letztere auch in üblichen Expressionsvektoren vorliegen kann. Der Ausdruck "Zellen" umfaßt Zellen jeglicher Art und Abstammung. Ferner umfaßt er Gewebe und Organismen, insbesondere Tiere und den Menschen.

Die Verabreichung von Substanzen, die Alopezie hemmen, kann in üblicher Weise, vorzugsweise lokal erfolgen. Auch können die Substanzen in üblichen Formulierungen vorliegen. Bei lokaler Verabreichung der Substanzen eignen sich z.B. Cremes, Salben, Shampoos und Haarwasser. Auch können die Substanzen in



Partikeln vorliegen, die leicht aufgenommen werden. Beispiele solcher Partikel sind Liposome. Der Fachmann kennt Verfahren, um für die einzelnen Substanzen die geeigneten Formulierungen bzw. Verabreichungsformen zu finden.

5

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein System zur Identifizierung von Substanzen, die sich zur Hemmung von Alopezie eignen. Ein solches System umfaßt die Erhöhung der zellulären Menge von Haarkeratinen und/oder von  
10 ihre Genexpression aktivierenden Substanzen. Insbesondere umfaßt das System Tiere oder Zellen, wobei Zellen bevorzugt sind, in denen ein oder mehrere exprimierbare Haarkeratin-Gene und/oder ein oder mehrere exprimierbare Gene, deren Genprodukte die Genexpression von Haarkeratinen aktivieren,  
15 jeweils fusioniert mit einem Reporter-Gen vorliegen. Die Haarkeratin-Gene können insbesondere jene von Ha1, Ha2, Ha3 und Ha4 sein. Ferner ist es günstig, wenn die die Genexpression von Haarkeratinen aktivierende Substanz ein Genprodukt des whn-Gens ist. Desweiteren können die  
20 vorstehenden Gene eine Wildtyp- oder eine veränderte Sequenz aufweisen, wobei sich letztere von der Wildtyp-Sequenz durch ein oder mehrere Basenpaare unterscheiden kann. Die Unterschiede können in Form von Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen von Basenpaaren vorliegen.  
25 Ferner kann ein vorstehendes Reporter-Gen jegliches sein, insbesondere kann es für ein Enzym, z.B. alkalische Phosphatase, oder ein fluoreszierendes Protein, z.B. GFP, kodieren. Desweiteren können die Fusionsgene extrachromosomal vorliegen oder im Zell-Genom, insbesondere anstelle eines oder  
30 beider Allele der Haarkeratine und/oder der Gene, deren Genprodukte die Expression von Haarkeratinen aktivieren. Ferner kann das System Stoffe enthalten, die sich zum Nachweis der exprimierten Haarkeratine und/oder von ihre Genexpression aktivierenden Substanzen bzw. der Fusionsgene, eignen. Solche  
35 Stoffe können sich zum Nachweis auf dem Nukleinsäure- bzw. Protein-Level eignen.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich Alopezie zu



hemmen. Ferner ist es möglich Alopezie zu diagnostizieren, in dem z.B. die Genexpression von Haarkeratinen und/oder von Substanzen bestimmt wird, welche diese aktivieren. Des weiteren ist es möglich Substanzen zu finden, die sich zur Hemmung von Alopezie eignen. Hierfür wird ein System bereitgestellt, das sich zum schnellen und zuverlässigen Screenen von verschiedensten Substanzen eignet. Damit stellt die vorliegende Erfindung Mittel bereit eine weit verbreitete Erkrankung des Haares zu diagnostizieren und zu therapieren.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

Fig. 1 zeigt eine in situ RNA-Hybridisierung mit einer Sonde für mHa3 in normalen (whn +/+) und mutanten (whn -/-) Mäusen. Die Transkripte für mHa3 (sichtbar als braune Silberkörner) sind in Haarfollikeln der Nacktmaus nicht nachweisbar. Die Linie entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

Fig. 2 zeigt die Expression von whn und Haarkeratinen im Haarfollikel der Maus.

A. Northern Filter-Hybridisierung mit RNA aus Gesamthaut von normalen Mäusen (whn +/+) und Nacktmäusen (whn -/-) mittels Sonden für hpvt- und whn-Gene sowie Ha1-, Ha3-, Ha4-Gene zu drei Zeitpunkten nach der Geburt dP7, 7 Tage nach Geburt etc.).

B. In situ RNA-Hybridisierung in Haut aus normalen (whn +/+) und Nacktmäusen (whn -/-) mit Sonden für Ha1-, Ha3- und Ha4-Gene. Ein Autoradiogramm von Hautschnitten am Tag 7 nach der Geburt ist gezeigt.

Fig. 3 zeigt die Regulation der Keratin-Gen-Expression. Hela-Zellen wurden mit einem whn-Expressions-Konstrukt transient transfiziert (+) und die



Anwesenheit von Ha3-spezifischer mRNA wurde über eine RT-PCR nachgewiesen. Die Molekulargewichtsmarker sind in bp angegeben.

5

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

10

**Beispiel 1: Nachweis des Verlustes der Expression des Ha3-Gens in Mäusen mit Alopezie.**

15

Es wurde das "Representational Difference Analysis" (RDA)-Verfahren durchgeführt. Dieses Verfahren umfaßt die Isolierung von mRNA aus Hautzellen von (whn +/+)-Mäusen bzw. (whn -/-)-Mäusen (Alopezie aufweisende Mäuse, die keine Expression des whn-Gens aufweisen), die Umschreibung der mRNA in cDNA und die Differenzierung der cDNA, wodurch solche identifiziert wird, die in (whn -/-)-Mäusen unter- bzw. überexprimiert wird.

20

25

A) Sequenz der Oligonukleotidadaptoren

Folgende Oligonukleotidadaptorenpaare wurden für die RDA benötigt:

30

R-Bgl-12: 5'-GATCTGCGGTGA-3'

R-Bgl-24: 5'-AGCACTCTCCAGCCTCTCACC GCA-3'

R-Bgl-12: 5'-GATCTGTTCATG-3'

R-Bgl-24: 5'-ACCGAAGTCCGACTATCCATGAACA-3'

35

N-Bgl-12: 5'-GATCTTCCCTCG-3'

N-Bgl-24: 5'-AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAA-3'





## B) Herstellung von poly A-mRNA aus den miteinander zu vergleichenden Geweben

5                   Zunächst wurde RNA aus der Haut von (whn +/+)-  
bzw. (whn -/-)-Mäusen nach der "Single-Step  
RNA-Extraction"-Methode (Chomczynski and  
Sacchi, 1987) gewonnen. Die poly A-mRNA-  
Fraktionen aus den beiden RNA-Populationen wur-  
den anschließend mit Hilfe von Dynabeads  
10                   Oligo(dT) nach dem entsprechenden Protokoll der  
Firma Dynal isoliert.

## C) Synthese doppelsträngiger cDNA

15                   Zur Synthese von doppelsträngiger (whn +/+)-  
bzw. (whn  
-/-)-cDNA wurde das "Ribo Clone cDNA Synthesis  
Kit" der Firma Promega verwendet. Jeweils 4 µg  
poly A-mRNA wurden eingesetzt, um ungefähr 2 µg  
20                   cDNA zu erhalten.

## D) Differenzanalyse

25                   1. Restriktionsverdau der doppelsträngigen  
cDNAs

30                   a) Ungefähr 2 µg jeder cDNA wurden in einem  
100 µl-Reaktionsansatz mit der  
Restriktionsendonuklease DpnII 2 h bei  
37°C verdaut.

35                   b) Die Reaktionslösungen wurden anschließend  
zweimal mit einem Phenol/Chloroform-  
Gemisch (1:1) und einmal mit 100%igem  
Chloroform extrahiert.

c) Die in den wäßrigen Phasen der beiden  
Reaktionsansätze enthaltene DNA wurde



jeweils mit 2  $\mu\text{g}$  Glykogen, 50  $\mu\text{l}$  10 M Ammoniumacetat und 650  $\mu\text{l}$  100% Ethanol versetzt und 20 min auf Eis gefällt.

5 Nach 14-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 14000 upm wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernung der  
10 alkoholischen Phase wurde die getrocknete DNA in 20  $\mu\text{l}$  TE-Puffer resuspendiert.

2. Ligation der cDNAs an das R-Bgl-Oligonukleotidadaptorenpaar

15

a) In einem Reaktionsgefäß wurden vereinigt:  
20  $\mu\text{l}$  geschnittene cDNA (gesamter Reaktionsansatz aus Punkt D)1c)

8  $\mu\text{g}$  R-Bgl-24

20

4  $\mu\text{g}$  R-Bgl-12

6  $\mu\text{l}$  10 x Ligase Puffer

x  $\mu\text{l}$  Wasser

57  $\mu\text{l}$  Endvolumen

25

b) Der Reaktionsansatz wurde in einem Thermocycler (Peltier Thermocycler PTC-200, MJ Research) auf 50°C erhitzt, 1 min auf dieser Temperatur gehalten und dann im Laufe einer Stunde wieder auf 10°C  
30 abgekühlt (ramp rate: 0,1°C/9 sec).

c) Nach Hinzufügen von 3  $\mu\text{l}$  T4 DNA Ligase (1 U/ $\mu\text{l}$ ) wurde das Gemisch über Nacht bei 16°C inkubiert.

35

3. Synthese von "Repräsentationen" der miteinander zu vergleichenden cDNA-



## Populationen

- 5 a) Zur Generierung sog. "Repräsentationen" der ligierten cDNAs wurde zunächst das Volumen der Ligationsansätze aus Punkt 2c) durch Zugabe von jeweils 140  $\mu$ l Wasser auf 200  $\mu$ l ergänzt.

10 Aus dieser verdünnten Lösung wurden dann pro cDNA-Population (whn +/+)- bzw. (whn -/-)-Haut 30 Reaktionen zu jeweils 200  $\mu$ l angesetzt.

15 Einem solchen Ansatz wurden der Reihe nach folgende Reaktanden zugegeben:

143  $\mu$ l Wasser  
20  $\mu$ l 10x PCR-Puffer  
20  $\mu$ l 2 mM dNTPs  
10  $\mu$ l 25 mM Mg-Chlorid  
20 2  $\mu$ l R-Bgl-24 (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)  
4  $\mu$ l verdünnter Ligationsansatz

- b) PCR:  
3 min: 72°C  
25 Hinzufügen von 1  $\mu$ l Taq-DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)  
20 x: 5 min: 95°C  
3 min: 72°C  
zuletzt: Abkühlen auf 4°C.

30 c) Zur Aufbereitung der Reaktionslösungen wurden jeweils 4 Reaktionsansätze in einem Gefäß vereinigt.

35 Extraktion: 2 x mit jeweils 700  $\mu$ l Phenol/Chloroform (1:1), 1 x mit Chloroform 100%;  
Fällung: Zugabe von 75  $\mu$ l 3 M Na-



Acetatlösung (pH 5,3) und 800  $\mu$ l 2-Propanol zu jedem Reaktionsgefäß, 20 min Eis.

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

5 Waschen des DNA-Pellets mit Ethanol 70% und Resuspension in soviel Wasser, daß eine Konzentration von 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l resultierte.

10

4. Restriktionsverdau der "Repräsentationen"

15

a) Zur Entfernung der R-Bgl-Oligonukleotidadaptoren wurden 300  $\mu$ g jeder Repräsentation (whn +/-)-Haut bzw. (whn -/-)-Haut einem Restriktionsverdau unterzogen. Es wurde nach Zugabe der folgenden Reaktanden 4 h bei 37°C inkubiert:

20

600  $\mu$ l cDNA-Repräsentation (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l)  
140  $\mu$ l 10 x DpnII-Puffer  
100  $\mu$ l DpnII (10 U/ $\mu$ l)  
560  $\mu$ l Wasser.

25

b) Der Restriktionsverdau-Ansatz wurde vor dessen Aufbereitung auf 2 Gefäße aufgeteilt.

30

Extraktion: 2 x Phenol/Chloroform (1:1), 1 x Chloroform 100%;

Fällung: Zugabe von 70  $\mu$ l 3 M Na-Acetat (pH 5,3), 700  $\mu$ l 2-Propanol zu jedem Gefäß, 20 min Eis;

35

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

Waschen des DNA-Pellets mit Ethanol 70% und Resuspension in soviel Wasser, daß eine Konzentration von 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l





resultierte.

Die so erhaltene, DpnII-verdaute (whn +/+)-Haut-cDNA-Repräsentation stellte die in der subtraktiven Hybridisierung einzusetzende Driver-DNA-Population dar.

#### 5. Synthese der Tester-DNA-Population

a) 20 µg der mit DpnII verdauten (whn -/-)-Haut-cDNA-Repräsentation (= Tester-DNA) wurden in einem TAE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt:

40 µl Tester-DNA (0,5 µg/µl)

50 µl Te-Puffer

10 µl 10 x Loading Buffer

wurden auf ein 1,2% Agarose-TAE-Gel aufgetragen. Es wurde solange Spannung an das Gel gelegt, bis die Bromphenolblau-Komponente des Loading Buffers ungefähr 2 cm weit gewandert war.

b) Anschließend wurden die Repräsentations-DNA enthaltenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des "Agarose Gel DNA Extraction Kits" der Firma Boehringer Mannheim eluiert.

Die DNA-Extrakte wurden vereinigt, so daß insgesamt 60 µl Lösung erhalten wurden. Die Konzentration dieser Lösung wurde durch Elektrophorese von 5 µl in einem 1% Agarose-Gel abgeschätzt.

c) Zuletzt erfolgte eine Ligation der Tester-DNA mit dem J-Oligonukleotid-Paar:  
2 µg Tester-DNA-Eluat



6  $\mu$ l 10 x Ligase Puffer  
 4  $\mu$ l J-Bgl-24 (2  $\mu$ g/ $\mu$ l)  
 4  $\mu$ l J-Bgl-12 (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)  
x  $\mu$ l Wasser

5 57  $\mu$ l Endvolumen

d) Überführung des Reaktionsansatzes in Thermocycler:

1 min: 50°C

10 Abkühlen auf 10°C in 1 h (ramp rate: 0,1°C/9 sec).

e) Nach Hinzufügen von 3  $\mu$ l T4 DNA Ligase (1 U/ $\mu$ l) Inkubation bei 16°C über Nacht.

15

f) Einstellung der Konzentration der Tester-DNA auf ungefähr 10 ng/ $\mu$ l durch Zugabe von 120  $\mu$ l Wasser.

20

## 6. Subtraktive Hybridisierung

a) 80  $\mu$ l Driver-DNA (40  $\mu$ g) aus Schritt 4. und 40  $\mu$ l (0,4  $\mu$ g) verdünnte, mit J-Oligonukleotiden ligierte Tester-DNA aus Schritt 5. wurden in einem Reaktionsgefäß vereinigt und 2 x mit Phenol/Chloroform (1:1) und einmal mit Chloroform 100% extrahiert.

25

b) Fällung durch Zugabe von 30  $\mu$ l 10 M Ammoniumacetat, 380  $\mu$ l Ethanol 100%; 10 min -70°C.

30

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

35

Anschließend: 2 x Waschen des Pellets



mit Ethanol 70%, kurze Zentrifugation nach jedem Waschschrift; Trocknen des DNA-Pellets.

5

- c) Die Resuspension der DNA erfolgte in 4  $\mu$ l EE x3-Puffer (30 mM EPPS, pH 8,0 bei 20°C (Firma Sigma), 3 mM EDTA) - hierbei wurde ungefähr 2 min auf- und abpipettiert, dann 5 min auf 37°C erwärmt, kurz "gevortext" und zuletzt die Lösung durch Zentrifugieren wieder am Gefäßboden vereinigt. Zuletzt wurde die Lösung mit 35  $\mu$ l Mineralöl überschichtet.

10

15

- d) Überführen des Reaktionsansatzes in Thermocycler:  
5 min: 98°C,  
Abkühlen auf 67°C und sofortige Zugabe von 1  $\mu$ l 5 M NaCl zur DNA, -  
20 h Inkubation bei 67°C.

20

#### 7. Synthese des ersten Differenzprodukts

25

- a) Nachdem das Mineralöl möglichst vollständig entfernt worden war, wurde die DNA schrittweise verdünnt:  
1. Zugabe von 8  $\mu$ l TE (+ 5  $\mu$ g/ $\mu$ l Hefe-RNA),  
2. Zugabe von 25  $\mu$ l TE - danach gründliches Mischen,  
3. Zugabe von 362  $\mu$ l TE - Vortex.

30

- b) Für jede subtraktive Hybridisierung wurden 4 PCRs angesetzt. Pro Reaktion:  
127  $\mu$ l Wasser  
20  $\mu$ l 10 x Puffer

35



20  $\mu$ l 2 mM dNTPs  
5  $\mu$ l 25 mM Mg-Chlorid  
20  $\mu$ l verdünnte Hybridisierungslösung (aus Schritt 7a))

5

## c) PCR-Programm:

3 min: 72°C

Zugabe von 1  $\mu$ l Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ l)

10

5 min: 72°C

Zugabe von 2  $\mu$ l Primer J-Bgl-24 (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)

10 x: 1 min: 95°C

3 min: 70°C

15

zuletzt: 10 min: 72°C; dann Abkühlen auf Raumtemperatur.

## d) Die 4 Reaktionsansätze wurden in einem 1,5 ml-Gefäß vereinigt.

Extraktion: 2 x Phenol/Chloroform (1:1), 1 x Chloroform 100%.

20

Nach Zugabe von 2  $\mu$ g Glykogen Carrier:Fällung mit 75  $\mu$ l 3 M Na-Acetat (pH 5,3), 800  $\mu$ l 2-Propanol, 20 min Eis.

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

25

Waschen des DNA-Pellets mit Ethanol 70%.

Nach Trocknen der DNA Resuspension in 40  $\mu$ l Wasser.e) 20  $\mu$ l der resuspendierten DNA aus d) wurden einem "Mung Bean Nuclease-Verdau" (=MBN) unterzogen:

30

20  $\mu$ l DNA4  $\mu$ l 10 x Mung Bean Nuclease Buffer (Fa. NEB)

35

14  $\mu$ l Wasser2  $\mu$ l Mung Bean Nuclease (10 U/ $\mu$ l; Fa. NEB)





35 min, 30°C.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 160 µl 50 mM Tris-HCl (pH 8,9) und 5-minütige Inkubation bei 98°C abgebrochen. Anschließend wurde das Gefäß bis zum nächsten Schritt auf Eis gesetzt.

f) Während der MBN-Inkubation wurden 4 weitere PCRs angesetzt (auf Eis):

127 µl Wasser

20 µl 2 mM dNTPs

10 µl 25 mM Mg-Chlorid

2 µl J-Bgl-24 (1 µg/µl)

20 µl MBN-verdaute DNA.

g) PCR-Programm:

1 min: 95°C

Abkühlenlassen auf 80°C, Zugabe von 1 µl Taq DNA Polymerase (5 U/µl),

18 x: 1 min: 95°C

3 min: 70°C,

zuletzt: 10 min: 72°C; Abkühlenlassen auf 4°C.

h) Die 4 PCR-Ansätze wurden in einem Gefäß vereinigt.

Extraktion: 2 x Phenol/Chloroform (1:1), 1 x Chloroform 100%.

Fällung: 75 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,3), 800 µl 2-Propanol, 20 min Eis.

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

Waschen des DNA-Pellets mit Ethanol 70%.

Resuspension der DNA in 100 µl Wasser (resultierende Konzentration: 0,5 µg/µl);



die auf diese Weise erhaltene Lösung stellte das erste Differenzprodukt dar.

8. Austausch der Oligonukleotidadaptoren des Differenzprodukts

a) Entfernung der Oligonukleotidadaptoren durch Restriktionsverdau mit DpnII:

40  $\mu$ l Differenzprodukt 1 (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l)

30  $\mu$ l 10 x DpnII Puffer

15  $\mu$ l DpnII (10 U/ $\mu$ l)

215  $\mu$ l Wasser

2 h 37°C.

b) Aufarbeitung des Reaktionsansatzes:

Extraktion: 2 x Phenol/Chloroform (1:1), 1 x Chloroform 100%.

Fällung: 33  $\mu$ l 3 M Na-Acetat (pH 5,3), 800  $\mu$ l Ethanol 100%, 20 min - 20°C.

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

Waschen des Pellets in Ethanol 70% und Resuspension in 40  $\mu$ l Wasser.

c) Ligation des Differenzprodukts an N-Bgl-Oligonukleotidadaptorenpaar

1  $\mu$ l der aufgearbeiteten DNA-Lösung aus Schritt b) wurde mit 9  $\mu$ l Wasser zu einer Konzentration von 50 ng/ $\mu$ l verdünnt; 4  $\mu$ l dieser Lösung wurden in folgender Reaktion eingesetzt:

4  $\mu$ l DpnII verdautes Differenzprodukt 1 (200 ng)

6  $\mu$ l 10 x Ligase Puffer

2,5  $\mu$ l N-Bgl-24 (3,5  $\mu$ g/ $\mu$ l)

2  $\mu$ l N-Bgl-12 (2  $\mu$ g/ $\mu$ l)



42,5  $\mu$ l Wasser.

d) Nach Überführen des Reaktionsansatzes in Thermocycler:

1 min: 50°C,

Abkühlenlassen innerhalb einer Stunde auf 10°C (ramp rate: 0,1°C/9 sec).

e) Nach Hinzugeben von 3  $\mu$ l T4 DNA Ligase (1  $\mu$ /μl), Inkubation bei 16°C über Nacht.

#### 9. Synthese des 2. Differenzprodukts

Der Ligationsansatz aus Schritt 8e) wurde durch Zugabe von 100  $\mu$ l Wasser auf eine Konzentration von 1,25 ng/ $\mu$ l verdünnt. 40  $\mu$ l dieser Verdünnung (50 ng) wurden mit 80  $\mu$ l Driver-DNA (siehe Punkt 4.) gemischt und erneut gemäß den Schritten 6. bis 8. behandelt. Beim Wechsel der Oligonukleotidadaptoren (Schritt 8.) wurden dieses Mal die J-Bgl-Oligonukleotide an das neu entstandene Differenzprodukt 2 ligiert.

#### 10. Synthese des 3. Differenzprodukts

Die Konzentration des mit den J-Bgl-Oligos ligierten Differenzprodukts 2 wurde auf eine Konzentration von 1 ng/ $\mu$ l reduziert. 10  $\mu$ l dieser Lösung wurden wiederum mit 990  $\mu$ l Wasser (+ 30  $\mu$ g Hefe-RNA) verdünnt, so daß die Konzentration nunmehr 10 pg/ $\mu$ l betrug. Die subtraktive Hybridisierung wurde mit 100 pg (10  $\mu$ l) J-ligiertem Differenzprodukt 2 und 40  $\mu$ g (80  $\mu$ l) Driver-DNA aus Schritt 4.) durchgeführt.



Ansonsten wurde wie beim 1. und 2. Differenzprodukt nach den Schritten 6. bis 8. vorgegangen. Eine Ausnahme bildete die PCR nach der MBN-Reaktion (Punkt 7.g) - hier wurden nur 18 statt 22 Cyclen durchgeführt.

#### 11. Klonierung des 3. Differenzprodukts

Das 3. Differenzprodukt wurde zunächst einem Restriktionsverdau mit DpnII unterzogen, wodurch die Oligonukleotidaptoren entfernt wurden. Das Reaktionsprodukt wurde anschließend auf ein TAE-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die getrennten DNA-Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA eluiert und in einen mit BamHI geschnittenen Vektor (pBS Not) kloniert.

#### 12. Charakterisierung der Differenzprodukte

Um zu bestätigen, daß es sich bei den klonierten DNA-Fragmenten nicht um Methodenartefakte handelte, sondern um Sequenzen, die tatsächlich in den untersuchten DNA-Repräsentationen enthalten waren, wurden Southern Analysen durchgeführt, bei denen die untersuchten cDNA-Repräsentationen mit den radioaktiv markierten Klonierungsprodukten hybridisiert wurden.

Anschließend wurden diejenigen DNA-Fragmente, die sich in der Southern Analyse als "echte" Differenzprodukte erwiesen hatten, mittels Northern Hybridisierungen untersucht: es wurden RNAs aus





den untersuchten Geweben (whn +/+)-Haut-cDNA und (whn -/-)-Haut-cDNA) geblottet und mit den radioaktiv markierten Klonierungsprodukten hybridisiert. Hierdurch wurde die differentielle Expression dieser Sequenzen in den untersuchten Geweben bestätigt. Eine Analyse der Sequenzen ergab, daß in nu/nu-Mäusen (Alopezie aufweisende Mäuse) das Ha3-Gen nicht exprimiert wird (vgl. Fig. 1).

**Beispiel 2: Expression von Haarkeratin- und whn-Genen in normalen und Alopezie aufweisenden Mäusen.**

Aus der Haut von unterschiedlich alten normalen (whn +/+) und nackten (whn -/-) Mäusen wurde RNA isoliert, in Agarose-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt, auf Filter transferiert und mit genspezifischen Sonden hybridisiert.

Die verwendeten Sonden waren wie folgt:

mHa1: Nukleotide 1331 - 1551; Genbank "Accession"-Nr. M27734

mHa3: Nukleotide 1007 - 1204; Genbank "Accession"-Nr. X75650

mHa4: Nukleotide 1303 - 1542, vgl. Bertolino, A.P. et al., J. Invest. Dermatol. 94, (1990) 297 - 303

whn: Nukleotide 1141 - 1374; Genbank "Accession"-Nr. X81593

Es zeigte sich, daß Haarkeratin- und whn-Gene in Alopezie aufweisenden Mäusen nicht bzw. nur schwach exprimiert werden.

**Beispiel 3: Nachweis der Expressions-Induktion des Ha3-Gens durch das Genprodukt des whn-Gens.**



Ein am N-terminalen Epitop "getaggt" whn-Gen wurde in den Expressionsvektor pTRE (Clontech) inseriert. Das erhaltene DNA-Konstrukt wurde für eine transiente Transfektion der Hela Tet-On Zell-Linie (Clontech) mittels des Calciumphosphat-Copräzipitations-Verfahrens verwendet. Die Zellen wurden unmittelbar danach mit 5 µg/ml Docyclin behandelt. 24 h später wurde 1 mM Natriumbutyrate zugegeben. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und einem RT-PCR-Verfahren unterzogen. Die im PCR-Verfahren verwendeten Primer waren wie folgt:

hHa3:

5'-CTGATCACCAACGTGGAGTC-3',

5'-TACCCAAAGGTGTTGCAAGG-3'.

Das PCR-Verfahren umfaßte 35-40 Zyklen mit jeweils 30 sec bei 95°C, 30 sec bei 58°C und 1 min bei 72°C.

Es zeigte sich, daß durch die Expression des whn-Gens eine Expression des Ha3-Gens induziert wurde. Parallele Kontrollen, in denen keine Transfektion mit dem whn-Gen erfolgte, führten zu keiner Induktion der Ha3-Gen-Expression.

#### **Beispiel 4: Herstellung eines erfindungsgemäßen Systems**

Aus einer BAC-Bibliothek der Firma Genome Systems (St. Louis, Missouri, USA;) wurde ein mit BAC-whn bezeichneter BAC-Klon isoliert, der das gesamte whn-Gen der Maus umfaßt (vgl. Schorpp, M. et al., Immunogenetics 46, (1997), 509-515).

Ferner wurde ein mit pMB096-whn-GFP bezeichneter Shuttle-Vektor verwendet, der das whn-Gen der Maus enthielt, wobei bei diesem in Exon3 das Reporter-Gen GFP vorlag (vgl. Nehls, M. et al., Science 272, (1996), 886-889).



BAC-whn wurde zur Transformation des recA<sup>+</sup> E.coli-Stammes CBTS verwendet. Die Transformation erfolgte durch Elektroporation. Klone wurden isoliert und mit pMB096-whn-GFP mittels Elektroporation transformiert. Es erfolgte eine homologe Rekombination zwischen dem BAC-Klon und dem Shuttle-Vektor im Bereich des whn-Gens, wodurch ein mit BAC-whn-GFP bezeichneter Vektor erhalten wurde. Dieser wies im whn-Gen das Reporter-Gen GFP auf.

BAC-whn-GFP wurde zur Transfektion von COS-Zellen verwendet. Die Transfektion erfolgte mittels des Calciumphosphat-Coprecipitations-Verfahrens. Es wurden COS-Zellen erhalten, die für ein Fusionsgen aus whn und GFP kodierten.

Es zeigte sich, daß diese Zellen geeignet waren, Substanzen zu identifizieren, welche die Genexpression von whn induzieren konnten. Solche Substanzen eigneten sich zur Hemmung von Alopezie.



K 2705

**Patentansprüche**

5

1. Verfahren zur Hemmung von Alopezie, umfassend die Erhöhung der zellulären Menge von Haarkeratinen.

10

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei den Zellen Haarkeratine zugegeben werden.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Haarkeratine in Form von sie exprimierender DNA vorliegen.

15

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3, wobei den Zellen die Genexpression von Haarkeratinen aktivierende Substanzen zugegeben werden.

20

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die Substanzen in Form von sie exprimierender DNA vorliegen.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-5, wobei die Haarkeratine Ha1, Ha2, Ha3 und Ha4 umfassen.

25

7. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, wobei die Substanzen das Genprodukt des whn-Gens und/oder die Expression des whn-Gens aktivierende Substanzen umfassen.

30

8. System zur Identifizierung von Alopezie hemmenden Stoffen, umfassend die Erhöhung der zellulären Menge von Haarkeratinen und/oder von ihre Genexpression aktivierenden Substanzen.

35

9. System nach Anspruch 8, wobei das System Zellen umfaßt, in denen ein oder mehrere exprimierende Haarkeratin-Gene fusioniert mit einem Reporter-Gen vorliegen.

10. System nach Anspruch 8 oder 9, wobei die Haarkeratine,





Ha1, Ha2, Ha3 und Ha4 umfassen.

- 5      11. System nach einem der Ansprüche 8 - 10, wobei das System Zellen umfaßt, in denen ein oder mehrere exprimierbare die Genexpression von Haarkeratinen aktivierende Substanzen fusioniert mit einem Reporter-Gen vorliegen.
- 10      12. System nach einem der Ansprüch 8 - 11, wobei die Substanzen ein Genprodukt des whn-Gens umfassen.
13. System nach einem der Ansprüche 9 - 12, wobei das Reporter-Gen für ein Enzym kodiert.
- 15      14. System nach einem der Ansprüche 9-12, wobei das Reporter-Gen für ein fluoreszierendes Protein kodiert.
15. System nach einem der Ansprüche 9-14, wobei die Fusionsgene extrachromosomal vorliegen.
- 20      16. System nach einem der Ansprüche 9-14, wobei die Fusionsgene im Zell-Genom integriert sind.
- 25      17. System nach einem der Ansprüche 9-16, wobei ferner Stoffe zum Nachweis der exprimierten Haarkeratine und/oder von ihre Genexpression aktivierende Substanzen bzw. der Fusionsgene vorliegen.



## **Zusammenfassung**

5

### **Hemmung von Alopezie**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Hemmung von Alopezie, umfassend die Erhöhung der zellulären Mengen von Haarkeratinen und ein System zur Identifizierung von Alopezie hemmenden Substanzen.

10



1/3

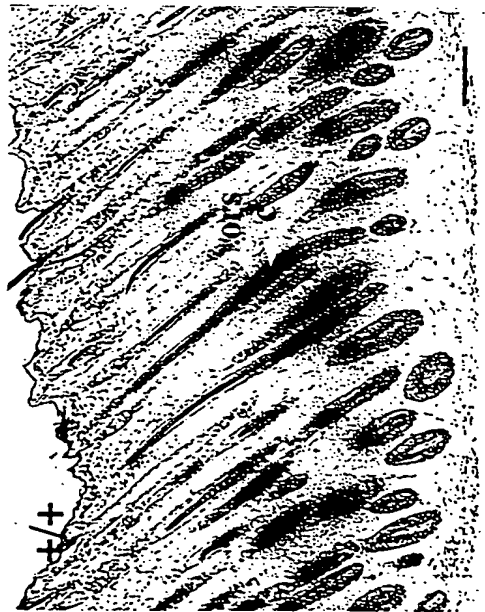


Fig. 1

528 Rec'd PCT/PTO

12 JAN 2001

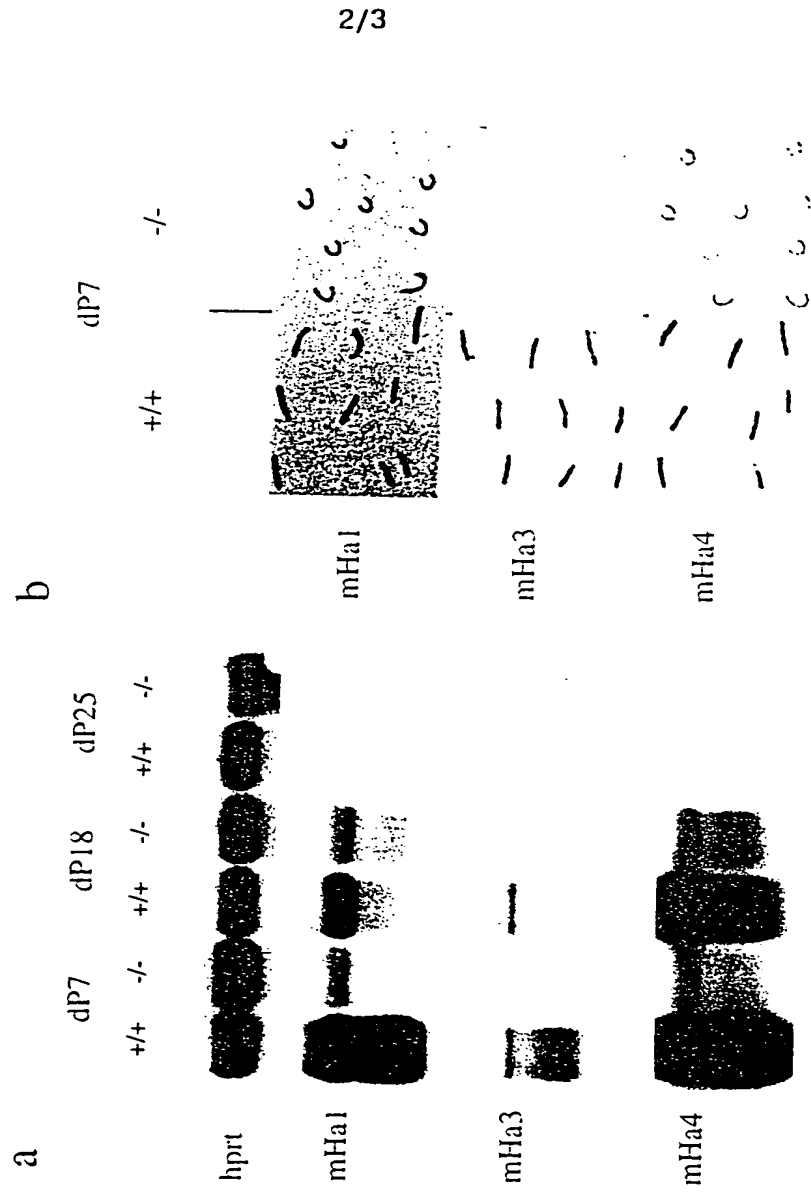


Fig. 2

528 Rec'd PCT/PTO 12 JAN 2001



3/3

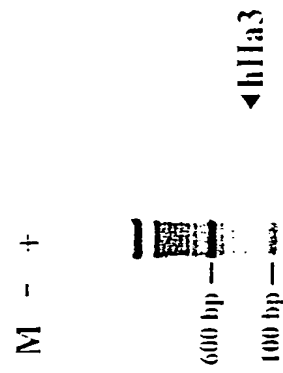


Fig. 3

528 Rec'd PCT/PTO 12 JAN 2001

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Deutsches Krebsforschungszentrum

<120> Hemmung von Alopezie

<130> K 2705

<140> PCT/DE99/02185

<141> 1999-07-13

<150> DE 198 31 043.9

<151> 1998-07-13

<160> 8

<170> PatentIn Ver 2.1.

<210> 1

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotidadaptor

<400> 1

gatctgcggt ga

12

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotidadaptor

<400> 2

agcactctcc agcctctcac cgca

24

<210> 3

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotidadaptor

RECEIVED 21 OCTOBER 1962

<400> 3

gatctgttca tg

12

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotidadaptor

<400> 4

accgacgtcg actatccatg aaca

24

<210> 5

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotidadaptor

<400> 5

gatcttccct cg

12

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotidadaptor

<400> 6

aggcaactgt gctatccgag ggaa

24

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:



Primer

<400> 7

ctgatcacca acgtggagtc

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Primer

<400> 8

taccctaaagg tggtgcaagg

20





PCT

# ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Anmeldeamt auszufüllen

09/743953

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmeldedatum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht) (max. 12 Zeichen) K 2705 - hu/msl

## Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Hemmung von Alopezie

## Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Deutsches Krebsforschungszentrum  
Stiftung des öffentlichen Rechts  
Im Neuenheimer Feld 280  
D-69129 Heidelberg

☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☒

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

## Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

BOEHM, Thomas  
Freiburger Str. 30  
D-79279 Vorstetten

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☐

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☒ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

## Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als:

☒

Anwalt

☐

gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

HUBER, Bernard  
Truderinger Str. 246  
D-81825 München

Telefonnr.:

089 / 42724748

Telefaxnr.:

089 / 42724749

Fernschreibnr.:

☐ Zustellanschrift: Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.



<b>Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER</b>	
<i>Wird keines der folgenden Felder benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigelegt werden.</i>	
Name und Anschrift: <i>(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</i>  SCHLAKE, Thomas Gartenweg 1  D-79194 Gundelfingen	Diese Person ist:  <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder <i>(Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</i>
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten	
Name und Anschrift: <i>(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</i>  MEIER, Natalia Gluckstraße 9  D-79104 Freiburg	Diese Person ist:  <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder <i>(Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</i>
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten	
Name und Anschrift: <i>(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</i>  	Diese Person ist:  <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder <i>(Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</i>
Staatsangehörigkeit (Staat):	Sitz oder Wohnsitz (Staat):
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten	
Name und Anschrift: <i>(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</i>  	Diese Person ist:  <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder <i>(Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</i>
Staatsangehörigkeit (Staat):	Sitz oder Wohnsitz (Staat):
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten	
Name und Anschrift: <i>(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</i>  	Diese Person ist:  <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder <i>(Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</i>
Staatsangehörigkeit (Staat):	Sitz oder Wohnsitz (Staat):
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten	
<input type="checkbox"/> Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.	



Feld Nr. V BESTIMMUNGEN IN STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☒ AP ARIPO-Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☒ EA Eurasisches Patent: AM Armenien, AZ Aserbaidshan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ EP Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ OA OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- |  |  |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albanien                          | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho   |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenien                          | <input checked="" type="checkbox"/> LT Litauen   |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Österreich                        | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxemburg   |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien                        | <input checked="" type="checkbox"/> LV Lettland  |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Aserbaidshan                      | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republik Moldau   |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina               | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagaskar  |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados                          | <input checked="" type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien   |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarien                         | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolei  |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brasilien                         | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi  |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus                           | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexiko  |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada                            | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norwegen  |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein  | <input checked="" type="checkbox"/> NZ Neuseeland  |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China                             | <input checked="" type="checkbox"/> PL Polen   |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Kuba                              | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal  |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik             | <input checked="" type="checkbox"/> RO Rumänien  |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland                                  | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation  |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Dänemark                          | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan   |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estland                           | <input checked="" type="checkbox"/> SE Schweden  |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spanien                           | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapur  |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finnland                          | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slowenien   |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich            | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slowakei  |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgien                          | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone  |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana                             | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tadschikistan   |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia                            | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan  |
| <input checked="" type="checkbox"/> GW Guinea-Bissau                     | <input checked="" type="checkbox"/> TR Türkei  |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Kroatien                          | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago   |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn                            | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine   |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesien                        | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda  |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel                            | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika  |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Island                            |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan                             | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Usbekistan  |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenia                             | <input checked="" type="checkbox"/> VN Vietnam   |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kirgisistan                       | <input checked="" type="checkbox"/> YU Jugoslawien   |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Simbabwe  |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea                    |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kasachstan                        | Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind: |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia                       | Indien   |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka                         | <input checked="" type="checkbox"/> Grenada  |
| <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia                           |  |

Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen: Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)



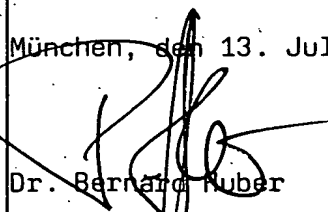
<b>Feld Nr. VI PRIORITÄTSRUCH</b>		<input type="checkbox"/> Weitere Rechtsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben.		
Anmeldedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen der früheren Anmeldung	Ist die frühere Anmeldung eine:		
		ationale Anmeldung: Staat	regionale Anmeldung: regionales Amt	internationale Anmeldung: Anmeldeamt
Zeile (1) 13 07 98 13. Juli 1998	198 31 043.9	DE		
Zeile (2)				
Zeile (3)				

☒ Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in der (den) Zeile(n) (1) bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist(sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist)

\* Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, so muß in dem Zusatzfeld mindestens ein Staat angegeben werden, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung eingereicht wurde.

<b>Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE</b> EPA	
Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA) (falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden)	Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche; Bezugnahme auf diese frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist):
ISA / EPA	Datum (Tag/Monat/Jahr)      Aktenzeichen      Staat (oder regionales Amt)

<b>Feld Nr. VIII KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE</b> deutsch	
Diese internationale Anmeldung enthält die folgende Anzahl von Blättern:	Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:
Antrag : 4	1. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung
Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil) : 20	2. <input type="checkbox"/> Gesonderte unterzeichnete Vollmacht
Ansprüche : 2	3. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden):
Zusammenfassung : 1	4. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen einer Unterschrift
Zeichnungen : 3	5. <input type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer gekennzeichnet:
Sequenzprotokollteil der Beschreibung :	6. <input type="checkbox"/> Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache:
Blattzahl insgesamt : 30	7. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material
Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.):	8. <input type="checkbox"/> Protokoll der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzen in computerlesbarer Form
	9. <input checked="" type="checkbox"/> Sonstige (einzeln auflühren): Scheck, Kopie f. Priobeleg
	Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird: deutsch

<b>Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS</b>	
Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.	
München, den 13. Juli 1999	
	
Dr. Bernard Huber	

Vom Anmeldeamt auszufüllen	
1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	2. Zeichnungen <input type="checkbox"/> eingegangen:  <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	
5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind): ISA /	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben.

Vom Internationalen Büro auszufüllen
Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:





VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>K 2705 - hu/msl</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/DE 99/02185</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>13/07/1999</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>13/07/1998</b>

Anmelder

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFE**

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der Sprache ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbaren Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerisierter Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in computerisierter Form eingereicht worden ist.

☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☒ Die Erklärung, daß die in computerisierter Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. \_\_\_\_\_

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.



**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.   
 weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich   
 **Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 1-7 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.**
2. ☐ Ansprüche Nr.   
 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.   
 weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/02185

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DD 58358	A		KEINE		
DE 19736198	C	24-12-1998	WO	9909156 A	25-02-1999



## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/12 A61K38/17 A61K48/00 G01N33/50

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>SCHÜDDEKOPF ET AL: "THE WHN TRANSCRIPTION FACTOR ENCODED BY THE NUDE LOCUS CONTAINS AN EVOLUTIONARY CONSERVED AND FUNCTIONALLY INDISPENSABLE ACTIVATION DOMAIN"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, USA,</p> <p>Bd. 93, 1996, Seiten 9661-9664,</p> <p>XP002130551</p> <p>Seite 9661</p> <p>Zusammenfassung</p> <p>Seite 9664, Absatz 5</p> <p style="text-align: center;">— — — — — -/-</p>	1-17

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

15. Februar 2000

Absenddatum des Internationalen Recherchenberichts

02/03/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 6818 Patentaan 2

NL - 2280 HV Rijswijk

Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,

Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Sitch, W





## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KUROOKA H ET AL: "Rescue of the hairless phenotype in nude mice by transgenic insertion of the wild-type Hfh11 genomic locus." INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, (1996 JUN) 8 (6) 961-6, XP000876588 Seite 961, Absatz 1 -Seite 962, Absatz 1 Seite 964, Absatz 6	1-17
X	DD 58 358 A (STOKOV ET AL)  das ganze Dokument	1,2,6,8, 10,17
A	KAIN S R ET AL: "GREEN FLUORESCENT PROTEIN AS A REPORTER OF GENE EXPRESSION AND PROTEIN LOCALIZATION" BIOTECHNIQUES,US,EATON PUBLISHING, NATICK, Bd. 19, Nr. 4, 1. Oktober 1995 (1995-10-01), Seiten 650-655, XP002033687 ISSN: 0736-6205 das ganze Dokument	8-17
A	FINK, P. ET AL: "A cDNA encoding the human type I hair keratin hHa1" BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA (1995), 1264(1), 12-14, XP000876612 das ganze Dokument	6,10
A	SHORPP ET AL: "CHARACTERIZATION OF MOUSE AND HUMAN NUDE GENES" IMMUNOGENETICS, Bd. 46, 1997, Seiten 509-515, XP000876601 in der Anmeldung erwähnt Seite 509 Zusammenfassung	
P,X	DE 197 36 198 C (DEUTSCHES KREBSFORSCH) 24. Dezember 1998 (1998-12-24) Seite 2, Zeile 3 -Seite 3, Zeile 12	1-17



# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN  
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

SCHÜSSLER, Andrea  
Truderinger Str. 246  
D-81825 München

Huber & Schöbier  
Patentanwälte

20. NOV. 2000

Frist: .....

## PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG  
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN  
PRÜFUNGSBERICHTS  
(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum  
(Tag/Monat/Jahr)

16. 11. 00

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts  
K 2705 - sch/mls

### WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE99/02185

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)  
13/07/1999

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)  
13/07/1998

Anmelder

DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFE

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

#### 4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt  
D-80298 München  
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d  
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Emslander, S

Tel. +49 89 2399-8718





PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 07 March 2000 (07.03.00)	
International application No. PCT/DE99/02185	Applicant's or agent's file reference K 2705 - hu/msl
International filing date (day/month/year) 13 July 1999 (13.07.99)	Priority date (day/month/year) 13 July 1998 (13.07.98)
Applicant BOEHM, Thomas et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

11 February 2000 (11.02.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

R. Forax

Telephone No.: (41-22) 338.83.38



Der Antrag ist bei der zuständigen mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde oder zwei oder mehr Behörden zuständig sind, bei der vom Anmelder gewählten Behörde einzureichen. Der Anmelder kann den Namen oder den Zweibuchstaben-Code der Behörde auf der nachstehenden Zeile angeben.

IPEA/ EPA

PCT

KAPITEL II

## ANTRAG AUF INTERNATIONALE VORLÄUFIGE PRÜFUNG

nach Artikel 31 des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens:  
Der (die) Unterzeichnete(n) beantragt (beantragen), daß für die nachstehend bezeichnete internationale Anmeldung die internationale vorläufige Prüfung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens durchgeführt wird.

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

Bezeichnung der IPEA	Eingangsdatum des ANTRAGS
----------------------	---------------------------

<b>Feld Nr. I KENNZEICHNUNG DER INTERNATIONALEN ANMELDUNG</b>		Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2705 - sch/msl
Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/02185	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 13. Juli 1999 (13.07.99)	(Frühester) Prioritätstag (Tag/Monat/Jahr) 13. Juli 1998 (13.07.98)
Bezeichnung der Erfindung Hemmung von Alopezie		
<b>Feld Nr. II ANMELDER</b>		
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname: bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)  Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts Im Neuenheimer Feld 280 D-69120 Heidelberg		Telefonnr.:  Telefaxnr.:  Fernschreibnr.:
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname: bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)  BOEHM, Thomas Freiburger Str. 30 D-79279 Vorstetten		
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname: bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)  SCHLAKE, Thomas Gartenweg 1 D-79194 Gundelfingen		
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Anmelder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.		





## Fortsetzung von Feld Nr. II ANMELDER

*Wird keines der folgenden Felder benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.*

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname: bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*

MEIER, Natalia  
Gluckstr. 9  
D-79104 Freiburg

Staatsangehörigkeit (Staat):  
DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):  
DE

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname: bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname: bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname: bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

☐ Weitere Anmelder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.



## Feld Nr. III ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT

- Die folgende Person ist ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter
- und ☒ ist vom (von den) Anmelder(n) bereits früher bestellt worden und vertritt ihn (sie) auch für die internationale vorläufige Prüfung.
- ☐ wird hiermit bestellt: eine etwaige frühere Bestellung eines Anwalts/gemeinsamen Vertreters wird hiermit widerrufen.
- ☐ wird hiermit zusätzlich zu dem bereits früher bestellten Anwalt/gemeinsamen Vertreter, nur für das Verfahren vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde bestellt.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

SCHÜBLER, Andrea  
Truderinger Str. 246  
D-81825 München

Telefonnr.:

089 / 42724748

Telefaxnr.:

089 / 42724749

Fernschreibnr.:

- ☐ Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben wird.

## Feld Nr. IV ERKLÄRUNG BETREFFEND ÄNDERUNGEN

Der Anmelder wünscht, daß die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde\*

- i) ☒ die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung aufnimmt.
- ii) ☐ die Änderungen nach Artikel 34
- ☐ der Beschreibung (Änderungen liegen bei)
- ☐ der Ansprüche (Änderungen liegen bei)
- ☐ der Zeichnungen (Änderungen liegen bei)
- berücksichtigt.
- iii) ☐ die beim Internationalen Büro eingereichten Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 berücksichtigt (Kopie liegt bei).
- iv) ☐ die Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 nicht berücksichtigt, sondern als überholt ansieht.
- v) ☐ den Beginn der internationalen vorläufigen Prüfung bis zum Ablauf von 20 Monaten ab dem Prioritätsdatum aufschiebt, sofern die Behörde nicht eine Kopie nach Artikel 19 vorgenommener Änderungen oder eine Erklärung des Anmelders erhält, daß er keine solchen Änderungen vornehmen will (Regel 69.1 d)). (Dieses Kästchen darf nur angekreuzt werden, wenn die Frist nach Artikel 19 noch nicht abgelaufen ist.)

- \* Wenn kein Kästchen angekreuzt wird, wird mit der internationalen vorläufigen Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung begonnen: wenn eine Kopie der Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 und/oder Änderungen der internationalen Anmeldung nach Artikel 34 bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde eingeht, bevor diese mit der Erstellung eines schriftlichen Bescheids oder des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts begonnen hat, wird jedoch die geänderte Fassung verwendet.

## Feld Nr. V BENENNUNG VON STAATEN ALS AUSGEWÄHLTE STAATEN

- ☒ Der Anmelder benennt als ausgewählte Staaten alle auswählbaren Staaten (das heißt, alle Staaten, die bestimmt wurden und durch Kapitel II des PCT gebunden sind) ausgenommen .....
- .....
- .....
- (Möchte der Anmelder bestimmte Staaten nicht auswählen, sind die Namen oder Zweibuchstaben-Codes dieser Staaten auf den obenstehenden Zeilen anzugeben.)



Feld Nr. VI KONTROLLISTE

Dem Antrag liegen folgende Unterlagen für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung bei:

- |   |           |
|---|-----------|
| 1. Änderungen nach Artikel 34                         |           |
| Beschreibung  | : Blätter |
| Ansprüche   | : Blätter |
| Zeichnungen   | : Blätter |
| 2. Begleitschreiben zu den Änderungen nach Artikel 34 | : Blätter |
| 3. Kopie der Änderungen nach Artikel 19               | : Blätter |
| 4. Kopie einer Erklärung nach Artikel 19              | : Blätter |
| 5. Sonstige (einzeln auflühren):                      | : Blätter |

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

erhalten                      nicht erhalten

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Dem Antrag liegen außerdem die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

- |  |   |
|--|---|
| 1. <input type="checkbox"/> unterzeichnete gesonderte Vollmacht        | 4. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung |
| 2. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht            | 5. <input type="checkbox"/> sonstige (einzeln auflühren):               |
| 3. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen der Unterschrift |   |

Feld Nr. VII UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS, ANWALTS ODER GEMEINSAMEN VERTRETERS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

München, 11. Februar 2000

*A. Schübler*

Dr. Andrea Schübler

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

1. Datum des tatsächlichen Eingangs des ANTRAGS:

2. Geändertes Eingangsdatum des Antrags aufgrund von BERICHTIGUNGEN nach Regel 60.1.b):

3. ☐ Eingangsdatum des Antrags NACH Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum: Punkt 4 und Punkt 5, unten, finden keine Anwendung. ☐ Der Anmelder wurde entsprechend unterrichtet

4. ☐ Eingangsdatum des Antrags INNERHALB 19 Monate ab Prioritätsdatum wegen Fristverlängerung nach Regel 80.5.

5. ☐ Das Eingangsdatum des Antrags liegt nach Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum, der verspätete Eingang ist aber nach Regel 82 ENTSCHULDIGT.

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Antrag vom IPEA erhalten am:



00 743983  
5650  
0500  
**Translation**

PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

RECEIVED  
MAY 16 2000  
TECH CENTER 1600/2900

Applicant's or agent's file reference K 2705 - sch/mls		<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE99/02185	International filing date (day/month/year) 13 July 1999 (13.07.99)	Priority date (day/month/year) 13 July 1998 (13.07.98)	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K14/00			
Applicant DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS			

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>9</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>2</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 11 February 2000 (11.02.00)	Date of completion of this report 16 November 2000 (16.11.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.





## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE99/02185

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-20, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. \_\_\_\_\_, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. 1-17, filed with the letter of 25 October 2000 (25.10.2000),  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1-4, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 99/02185

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of:

This report makes reference to the following documents:

- D1: KUROOKA H ET AL.: "Rescue of the hairless phenotype in nude mice by transgenic insertion of the wild-type Hfh11 genomic locus." INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, (1996 JUN) 8 (6) 961-6., XP000876588
- D2: DD 58 358 A (STOKOV ET AL.)



**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

1. With the exception of the whn gene, no substances that activate the gene expression of hair keratins are known or disclosed per se in the present application. Therefore, Claims 4, 5, 11 and 17 can only be examined insofar as they pertain to the whn gene.

2. Substances that activate the expression of the whn gene are neither known from the prior art nor disclosed per se in the present application. Therefore, insofar as Claim 7 pertains to such substances, said claim cannot be examined.

3. Claims 1-7 pertain, at least in part, to subject matter which, in the opinion of the Examining Authority, falls under PCT Rule 67.1(iv). Therefore, no expert report has been established concerning the industrial applicability of the subject matter of said claims (PCT Article 34(4)(a)(i)).

3.1 The PCT Contracting States do not have uniform criteria for assessing the industrial applicability of the subject of Claims 1-7 in their present form. Patentability may depend on the wording of the claims. The EPO, for example, does not recognize the industrial applicability of claims to the medical use of a compound; it does, however, allow claims to the first medical use of a known compound or the use of such a compound to manufacture a drug for a new medical application.

2000

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/DE 99/02185

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV

The present application contains two groups of inventions that are not linked so as to form a single general inventive concept:

**Group 1 (Claims 1-7):** A method for inhibiting alopecia, consisting in the increase of the number of hair keratin cells by adding hair keratins or substances that activate the gene expression of hair keratins.

**Group 2 (Claims 8-17):** A method for identifying alopecia-inhibiting substances, consisting in the increase of the number of hair keratin cells and/or of substances that activate their gene expression and contain cells having hair keratin genes fused with a reporter gene, or those that contain substances that can be expressed and that activate the gene expression of hair keratins, fused with a reporter gene.

The technical relationship between the above-mentioned groups of inventions is expressed in the following same technical features:

The inhibition of alopecia, consisting in the increase of the number of hair keratin cells.

Such a method is, however, not novel over D1 (in this context see also Box V): D1 discloses a method for inhibiting alopecia in which the whn gene is inserted into the fertilized egg cells of nude mice. Since the whn gene increases the expression of the hair keratin gene Ha3 (cf. the present application), the method disclosed





# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 99/02185

## Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV

in D1 inherently represents a method for inhibiting alopecia that consists in the increase of the number of hair keratin cells.

However, there is no technical relationship linking the above-mentioned groups of inventions that is expressed in one or more of the same or corresponding special technical feature(s), and therefore said groups of inventions are not so linked as to form a single general inventive concept (PCT Rule 13(1) and (2), Lack of Unity of Invention, *a posteriori*).

Since the examination of both inventions does not represent an extraordinary burden, the applicant will not be requested to restrict the scope of the application or to pay an additional examination fee.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 99/02185

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	2, 3, 8-17	YES
	Claims	1, 4-7	NO
Inventive step (IS)	Claims	2, 3, 9, 10	YES
	Claims	8, 11-17	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	8-17	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

#### 1. PCT Article 33(2), Novelty

D1 discloses a method in which a whn gene is inserted into the fertilized egg cells of nude mice. The resulting transgenic mice have white hair that is less dense than that of wild-type mice.

The present application teaches that whn increases the expression of hair keratins, thereby inhibiting alopecia.

Therefore, the method disclosed in D1 inherently represents a method that causes an increase in the number of hair keratin cells. The present application contains no suggestion that the expression "inhibition" means a total inhibition, and therefore said application also includes partial inhibition as indicated in D1. Further, the methods of Claims 1 and 4-7 contain the same method steps as the method disclosed in D1. Therefore it is to be expected that the methods of said claims have the same effect as in D1 and thereby cause the same type of inhibition.

Consequently, D1 is prejudicial to the novelty of **Claims 1 and 4-7**.



**2. PCT Article 33(3), Inventive Step**

It is clear to a person skilled in the art from D1 that an increase in the expression of the whn gene inhibits alopecia. Since such inhibition represents a generally worthwhile aim, it would be obvious to a person skilled in the art to also identify substances that increase the expression of the whn gene. However, identifying substances that increase the expression of a known gene is a matter of standard practice that a person skilled in the art would carry out without thereby being inventive. In order to identify such substances, a person skilled in the art would, with the help of routine methods, likewise make available cells containing a whn gene fused with a reporter gene. Therefore **Claims 8, 11 and 12** are not inventive. **Claims 13-17** likewise fail to involve an inventive step, since they describe embodiments of the non-inventive methods of Claims 11 and 12 that were produced solely according to routine practices.

**3. Additional Remarks:**

For the examination of Claims 2, 3, 9 and 10, document D2 was considered the closest prior art. Said document discloses a keratin partial hydrolysate for the prevention of hair loss. The difference between Claims 2 and 3 therefore consists in the use of whole keratin molecules. There is no suggestion in the relevant prior art that would lead a person skilled in the art to inhibit alopecia by adding whole keratins. Therefore Claims 2, 3, 9 and 10 are novel and appear to be inventive.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/DE 99/02185

## VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

### **PCT Article 6, Lack of Clarity**

1. The method in Claim 1 is described only in terms of the aim to be achieved. The claim fails to contain any technical features that indicate how to cause an increase in the hair keratins. Claim 1 is not clear due to the lack of said technical features, which are regarded as essential.

2. Claim 8 likewise contains a result to be achieved ("an increase in the number of... cells"), without indicating how said result can be achieved. Further, it is not clear from said claim how the measurement of said result can be used in the identification of alopecia-inhibiting substances. Claim 8 therefore lacks clarity.





# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)





Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2705 - sch/mls	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/02185	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 13/07/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 13/07/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C07K14/00		
Anmelder DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFE		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 9 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.  
  
☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).  
  
 Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  11/02/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  17. 6. 11. 00
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Barnas, C  Tel. Nr. +49 89 2399 7469  



**I. Grundlage des Berichts**

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

**Beschreibung, Seiten:**

1-20                      ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-17                      eingegangen am                      26/10/2000    mit Schreiben vom    25/10/2000

**Zeichnungen, Blätter:**

1-4                      ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen Behörde in der Sprache: , zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, dass das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, dass die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:



- ☐ Beschreibung,      Seiten:  
☐ Ansprüche,      Nr.:  
☐ Zeichnungen,      Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit**

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.  
☒ Ansprüche Nr. 1-7, 11, 17 (teilweise).

**Begründung:**

- ☒ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 1-7 (Industrielle Anwendung, teilweise) beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):  
**siehe Beiblatt**
- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- ☒ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 4, 5, 7, 11, 17 (teilweise) sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.
2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:
- ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
- ☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.



**IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung**

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:
- ☐ die Ansprüche eingeschränkt.
  - ☐ zusätzliche Gebühren entrichtet.
  - ☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
  - ☐ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.
2. ☒ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.
3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3
- ☐ erfüllt ist
  - ☒ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:  
**siehe Beiblatt**
4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:
- ☒ alle Teile.
  - ☐ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.

**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

**1. Feststellung**

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	2, 3, 8-17
	Nein: Ansprüche	1, 4-7
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	2, 3, 9, 10
	Nein: Ansprüche	8, 11-17
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	8-17
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen  
sieh Beiblatt**

**VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**





**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER  
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/02185

---

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:  
**siehe Beiblatt**



**Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:**

- D1: KUROOKA H ET AL: 'Rescue of the hairless phenotype in nude mice by transgenic insertion of the wild-type Hfh11 genomic locus.' INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, (1996 JUN) 8 (6) 961-6. , XP000876588
- D2: DD 58 358 A (STOKOV ET AL)

**Zu Punkt III**

**Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit**

1. Mit Ausnahme des whn-Gens sind keine, die Genexpression von Haarkeratinen aktivierende Substanzen bekannt oder in der vorliegenden Anmeldung als solche offenbart. Ansprüche 4, 5, 11 und 17 können daher nur geprüft werden sofern sie sich auf das whn-Gen beziehen.
  2. Substanzen, die die Expression des whn-Gens aktivieren sind weder aus dem Stand der Technik bekannt noch wurden solche Substanzen in der vorliegenden Anmeldung als solche offenbart. Anspruch 7 kann daher, sofern er sich auf solche Substanzen bezieht nicht geprüft werden.
  3. Die Ansprüche 1-7 beziehen sich zumindest teilweise auf einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67.1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieser Ansprüche kein Gutachten erstellt (Artikel 34(4) a) (i) PCT).
- 3.1. Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 1-7 gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.



#### **Zu Punkt IV**

##### **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung**

Die vorliegende Anmeldung enthält zwei Gruppen von Erfindungen, die sind nicht durch eine einzige allgemeine erfinderische Idee verbunden sind:

**Gruppe 1 (Ansprüche 1-7):** Verfahren zur Hemmung von Alopezie, umfassend die Erhöhung der zellulären Menge von Haakeratinen durch Zugabe von Haakeratinen oder durch Zugabe von die Genexpression von Haakeratinen aktivierenden Substanzen.

**Gruppe 2 (Ansprüche 8-17):** Verfahren zur Identifizierung von Alopezie hemmenden Stoffen umfassend die Erhöhung der zellulären Menge von Haakeratinen und /oder von ihre Genexpression aktivierenden Substanzen umfassend Zellen mit Haakeratin-Genen fusioniert mit einem Reporter-Gen oder umfassend exprimierbare, die Genexpression von Haakeratinen aktivierende Substanzen fusioniert mit einem Reporter-Gen.

Der technische Zusammenhang, der zwischen den angeführten Gruppen von Erfindungen kommt in den folgenden gleichen technischen Merkmalen zum Ausdruck:

Hemmung von Alopezie, umfassend die Erhöhung der zellulären Menge von Haakeratinen.

Ein solches Verfahren ist jedoch gegenüber D1 nicht neu (siehe in diesem Zusammenhang auch Zu Punkt V): D1 offenbart ein Verfahren zur Hemmung von Alopezie bei dem das whn-Gen in die befruchteten Eizellen von Nacktmäusen eingebracht wird. Da das whn-Gen die Expression des Haakeratin-Gen Ha3 erhöht (siehe vorliegende Anmeldung), stellt das in D1 offenbarte Verfahren inhärent ein Verfahren zur Hemmung von Alopezie, umfassend die Erhöhung der zellulären Menge von Haakeratinen dar.

Zwischen den angeführten Gruppen von Erfindungen besteht daher kein technischer Zusammenhang, der in einem oder mehreren gleichen oder entsprechenden besonderen technischen Merkmal/en zum Ausdruck kommt und besagte Gruppen von Erfindungen sind somit nicht durch eine einzige allgemeine erfinderische Idee verbunden (Regel 13 (1)(2) PCT, Mangelnde Einheitlichkeit, a posteriori).



Da die Prüfung beider Erfindungen keinen besonderen Aufwand darstellt, wird der Anmelder nicht aufgefordert die Anmeldung zu beschränken oder eine zusätzliche Prüfungsgebühr zu entrichten.

### **Zu Punkt V**

**Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

#### **1. Art. 33(2) PCT, Neuheit**

D1 offenbart ein Verfahren bei dem das whn-Gen in die befruchteten Eizellen von Nacktmäusen eingebracht wird. Die daraus resultierenden transgenen Mäuse haben weiße Haare welche in einer geringeren Dichte als bei wild-typ Mäusen auftreten.

Die vorliegende Anmeldung beinhaltet die Lehre, daß whn die Expression von Haarkeratinen erhöht und daß dadurch Alopezie gehemmt wird.

Das in D1 offenbarte Verfahren stellt daher inhärent ein Verfahren dar welches eine Erhöhung der zellulären Menge von Haarkeratinen bewirkt. In der vorliegenden Anmeldung findet sich kein Hinweis, daß mit dem Begriff "Hemmung" eine absolute Hemmung zu verstehen ist und umfaßt somit auch eine teilweise Hemmung wie sie in D1 gezeigt wird. Weiters beinhalten die Verfahren der Ansprüche 1 und 4-7 dieselben Verfahrensschritte wie das Verfahre welches in D1 offenbart wird. Es ist daher zu erwarten, daß durch die Verfahren besagter Ansprüche dasselbe Ergebnis erzielt wird wie in D1 und somit dieselbe Art von Hemmung bewirkt wird.

D1 ist daher neuheitsschädlich für **Ansprüche 1 und 4-7.**

#### **2. Art. 33(3) PCT, Erfinderische Tätigkeit**

Aus D1 ist dem Fachmann klar, daß eine Erhöhung der Expression des whn-Gens Alopezie hemmt. Da diese Hemmung ein allgemein erstrebenswertes Ziel darstellt, wäre es daher für den Fachmann naheliegend, auch Stoffe zu identifizieren, die die Expression des whn-Gens erhöhen. Die Identifizierung von Stoffen, die die Expression eines





bekannten Genes erhöhen stellt jedoch ein Routineverfahren dar welches der Fachmann ohne erfinderische Zutun durchführen würde. Um solche Stoffe zu identifizieren würde der Fachmann auch, mit Hilfe von Routineverfahren, Zellen bereitstellen in denen das wnh-Gen fusioniert mit einem Reporter Gen vorliegt. **Ansprüche 8, 11 und 12** sind daher nicht erfinderisch. Auch die **Ansprüche 13-17** beinhalten keinen erfinderische Tätigkeit, da sie nur routinemäßig bereitgestellte Ausführungsformen der nicht erfinderischen Verfahren der Ansprüchen 11 und 12 beschreiben.

### **3. Zusätzliche Bemerkungen:**

Für die Prüfung der Ansprüche 2, 3, 9 und 10 wurde D2 als nächster Stand der Technik herangezogen. Besagtes Dokument offenbart ein Keratin-Partial-Hydrolysat zur Verhinderung des Haarausfalls. Der Unterschied zwischen Ansprüchen 2 und 3 besteht daher in der Verwendung ganzer Keratin Moleküle. Im zitierten Stand der Technik findet sich kein Hinweis, der den Fachmann veranlassen würde Alopezie durch die Zugabe von ganzen Keratinen zu hemmen. Ansprüche 2, 3, 9 und 10 sind daher neu und scheinen erfinderisch.

### **Zu Punkt VIII**

#### **Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

#### **Art. 6 PCT, Mangelnde Klarheit**

1 Das Verfahren von Anspruch 1 ist nur durch das zu erreichende Ergebnis angegeben. Der Anspruch enthält jedoch keine technische Merkmale, die angeben wie eine Erhöhung der Haarkeratine zu bewerkstelligen ist. Aufgrund des Fehlens besagter technischer Merkmale, die als wesentlich angesehen werden, ist Anspruch 1 nicht klar.

2. Auch Anspruch 8 enthält ein zu erreichendes Ergebnis ("Erhöhung der zellulären Menge ...") ohne anzugeben wie dieses Ergebnis erreicht werden kann. Weiters ist aus besagtem Anspruch nicht ersichtlich wie die Messung dieses Ergebnisses für die Identifizierung von Alopezie hemmenden Stoffen verwendet werden kann. Anspruch 8 ist daher nicht klar.



Amtl. Aktenzeichen: PCT/DE99/02185

Unser Zeichen: K 2705 - hu / msl

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Hemmung von Alopezie, umfassend die Erhöhung der zellulären Menge von Haarkeratinen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei den Zellen Haarkeratine zugegeben werden.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Haarkeratine in Form von sie exprimierender DNA vorliegen.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3, wobei den Zellen die Genexpression von Haarkeratinen aktivierende Substanzen zugegeben werden.
5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die Substanzen in Form von sie exprimierender DNA vorliegen.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-5, wobei die Haarkeratine Ha1, Ha2, Ha3 und Ha4 umfassen.
7. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, wobei die Substanzen das Genprodukt des whn-Gens und/oder die Expression des whn-Gens aktivierende Substanzen umfassen.
8. Verfahren zur Identifizierung von Alopezie hemmenden Stoffen, bei dem die Erhöhung der zellulären Menge von Haarkeratinen und/oder von ihre Genexpression aktivierenden Substanzen bestimmt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei Zellen verwendet werden, in denen ein oder mehrere exprimierende Haarkeratin-Gene fusioniert mit einem Reporter-Gen vorliegen.



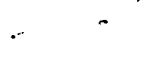
10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, wobei die Haarkeratine, Ha1, Ha2, Ha3 und Ha4 umfassen.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 - 10, wobei Zellen verwendet werden, in denen ein oder mehrere exprimierbare die Genexpression von Haarkeratinen aktivierende Substanzen fusioniert mit einem Reporter-Gen vorliegen.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 - 11, wobei die Substanzen ein Genprodukt des wtn-Gens umfassen.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 - 12, wobei das Reporter-Gen für ein Enzym kodiert.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 9-12, wobei das Reporter-Gen für ein fluoreszierendes Protein kodiert.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 9-14, wobei die Fusionsgene extrachromosomal vorliegen.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 9-14, wobei die Fusionsgene im Zell-Genom integriert sind.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 9-16, wobei ferner Stoffe zum Nachweis der exprimierten Haarkeratine und/oder von ihre Genexpression aktivierende Substanzen bzw. der Fusionsgene verwendet werden.



## Claims

1. A process for inhibiting alopecia, comprising the increase in the cellular amount of hair keratins.
2. The process according to claim 1, wherein hair keratins are added to the cells.
3. The process according to claim 2, wherein the hair keratins are present in the form of DNA expressing the same.
4. The process according to any one of claims 1 to 3, wherein the gene expression of substances activating hair keratins are added to the cells.
5. The process according to claim 4, wherein the substances are present in the form of DNA expressing the same.
6. The process according to any one of claims 1 to 5, wherein the hair keratins comprise Ha1, Ha2, Ha3 and Ha4.
7. The process according to claim 4 or 5, wherein the substances comprise the gene product of the whn gene and/or the expression of substances activating the whn gene.
8. A system of identifying alopecia-inhibiting substances, comprising the increase in the cellular amount of hair keratins and/or of substances activating the gene expression thereof.
9. The system according to claim 8, wherein the system comprises cells in which one or several expressing hair keratin genes are present in fused form with a reporter gene.

REPLACED BY  
ART 34 ANDT





10. The system according to claim 8 or 9, wherein the hair keratins comprise Ha1, Ha2, Ha3, and Ha4.
11. The system according to any one of claims 8 to 10, wherein the system comprises cells in which one or several expressible substances activating the gene expression of hair keratins are present in fused form with the reporter gene.
12. The system according to any one of claims 8 to 11, wherein the substances comprise a gene product of the whn gene.
13. The system according to any one of claims 9 to 12, wherein the reporter gene codes for an enzyme.
14. The system according to any one of claims 9 to 12, wherein the reporter gene codes for a fluorescent protein.
15. The system according to any one of claims 9 to 14, wherein the fusion genes are present in extrachromosomal form.
16. The system according to any one of claims 9 to 14, wherein the fusion genes are integrated in the cell genome.
17. The system according to any one of claims 9 to 16, which also comprises substances for the detection of the expressed hair keratins and/or of substances activating the gene expression thereof and fusion genes, respectively.



Amtl. Aktenzeichen: PCT/DE99/02185  
Unser Zeichen: K 2705 - hu / msl

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Hemmung von Alopezie, umfassend die Erhöhung der zellulären Menge von Haarkeratinen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei den Zellen Haarkeratine zugegeben werden.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Haarkeratine in Form von sie exprimierender DNA vorliegen.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3, wobei den Zellen die Genexpression von Haarkeratinen aktivierende Substanzen zugegeben werden.
5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die Substanzen in Form von sie exprimierender DNA vorliegen.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-5, wobei die Haarkeratine Ha1, Ha2, Ha3 und Ha4 umfassen.
7. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, wobei die Substanzen das Genprodukt des whn-Gens und/oder die Expression des whn-Gens aktivierende Substanzen umfassen.
8. Verfahren zur Identifizierung von Alopezie hemmenden Stoffen, bei dem die Erhöhung der zellulären Menge von Haarkeratinen und/oder von ihre Genexpression aktivierenden Substanzen bestimmt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei Zellen verwendet werden, in denen ein oder mehrere exprimierende Haarkeratin-Gene fusioniert mit einem Reporter-Gen vorliegen.

100-443887-100  
 100-443887-100

10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, wobei die Haarkeratine, Ha1, Ha2, Ha3 und Ha4 umfassen.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 - 10, wobei Zellen verwendet werden, in denen ein oder mehrere exprimierbare die Genexpression von Haarkeratinen aktivierende Substanzen fusioniert mit einem Reporter-Gen vorliegen.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 - 11, wobei die Substanzen ein Genprodukt des wtn-Gens umfassen.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 - 12, wobei das Reporter-Gen für ein Enzym kodiert.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 9-12, wobei das Reporter-Gen für ein fluoreszierendes Protein kodiert.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 9-14, wobei die Fusionsgene extrachromosomal vorliegen.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 9-14, wobei die Fusionsgene im Zell-Genom integriert sind.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 9-16, wobei ferner Stoffe zum Nachweis der exprimierten Haarkeratine und/oder von ihre Genexpression aktivierende Substanzen bzw. der Fusionsgene verwendet werden.

